

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-325282

(43) 公開日 平成8年(1996)12月10日

(51) Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 F 9/655		9450-4H	C 0 7 F 9/655	
A 6 1 K 31/665	A B J		A 6 1 K 31/665	A B J
31/675	A D F		31/675	A D F
C 0 7 F 9/6558		9450-4H	C 0 7 F 9/6558	

審査請求 未請求 請求項の数15 F D (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願平8-104498

(22) 出願日 平成8年(1996)4月1日

(31) 優先権主張番号 特願平7-100503

(32) 優先日 平7(1995)3月31日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000228590

日本ケミファ株式会社

東京都千代田区岩本町2丁目2番3号

(72) 発明者 野村 豊

千葉県野田市三ッ堀832-113

(72) 発明者 高橋 俊弘

埼玉県三郷市彦成4丁目1-6-505

(72) 発明者 原 薫

埼玉県三郷市早稲田6-4-2-201

(72) 発明者 吉野 康

千葉県習志野市谷津5-19-7

(72) 発明者 真崎 光夫

千葉県千葉市美浜区真砂5-11-6

(74) 代理人 弁理士 柳川 泰男

(54) 【発明の名称】 ビスホスホン酸誘導体

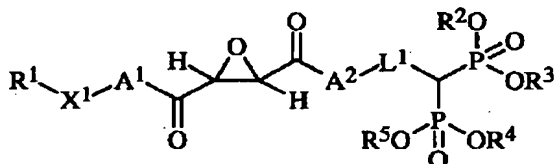
(57) 【要約】

【課題】 骨疾患の治療薬として、そしてカテプシンLおよびBの異常亢進が関与する疾患の治療や予防に有効な薬剤を提供する。

【解決手段】 エポキシコハク酸の部分構造を有し、システインプロテアーゼ阻害活性を示すビスホスホン酸誘導体、特に下記のビスホスホン酸誘導体またはその塩：

【化1】

(I)



(上記式において、R<sup>1</sup> は、水素原子、アルキルまたはアラキルであり；X<sup>1</sup>は、-O-、-NR<sup>6</sup>-または二価の複素環残基であり；A<sup>1</sup> は、単結合あるいは右側をN末端とするアミノ酸残基またはジペプチド残基であり；A<sup>2</sup> は、単結合あるいは左側をN末端とするアミノ酸残基またはジペプチド残基であり；L<sup>1</sup>は二価の連結

基であり；そして、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup> およびR<sup>6</sup> は、それぞれ独立に、水素原子、アルキルまたはアラキルである。)

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 エポキシコハク酸の部分構造を有し、システインプロテアーゼ阻害活性を示すビスホスホン酸誘導体。

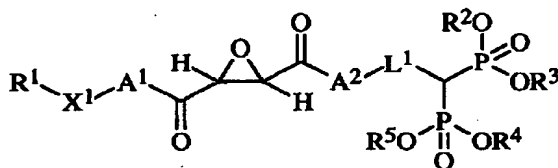
【請求項 2】 物理化学的変換あるいは生体内で代謝を受けて、システインプロテアーゼ阻害活性を示すエポキシコハク酸誘導体を放出する、エポキシコハク酸の部分構造と連結基の部分構造とを有する請求の範囲第 1 項に記載のビスホスホン酸誘導体。

【請求項 3】 エポキシコハク酸のカルボニル基が連結基でビスホスホン酸構造に結合している請求の範囲第 1 項記載のビスホスホン酸誘導体。

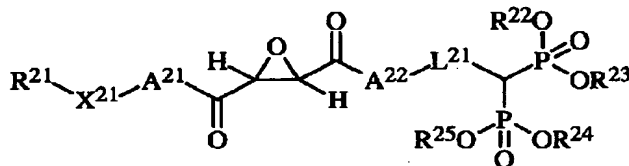
【請求項 4】 下記式 (I) で表わされるビスホスホン酸誘導体またはその塩：

【化 1】

(I)



(II)

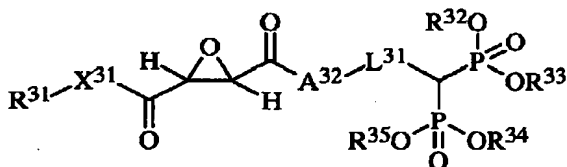


上記の式において、 $R^{21}$ は、アルキル基またはアラルキル基であり； $X^{21}$ は、 $-NR^{26}-$ または二価の複素環残基であり； $A^{21}$ は、単結合あるいは右側をN末端とするアミノ酸残基またはジペプチド残基であり； $A^{22}$ は、単結合あるいは左側をN末端とするアミノ酸残基であり； $L^{21}$ は、 $-O-$ 、 $-NR^{27}-$ 、二価の複素環残基、アルキレン基、 $-CO-$ 、フェニレン基およびそれらの組み合わせからなる群より選ばれる二価の連結基であり；そして、 $R^{22}$ 、 $R^{23}$ 、 $R^{24}$ 、 $R^{25}$ 、 $R^{26}$ および $R^{27}$ は、それぞれ独立に、水素原子、アルキル基またはアラルキル基である。

【請求項 7】 下記式 (III) で表わされるビスホスホン酸誘導体またはその塩：

【化 3】

(III)



上記式において、 $R^{31}$ は、水素原子、アルキル基またはアラルキル基であり； $X^{31}$ は、 $-O-$ または $-NR^{36}-$ であり； $A^{31}$ は、単結合あるいは左側をN末端とするア

2

\* 上記式において、 $R^1$ は、水素原子、アルキル基またはアラルキル基であり； $X^1$ は、 $-O-$ 、 $-NR^6-$ または二価の複素環残基であり； $A^1$ は、単結合あるいは右側をN末端とするアミノ酸残基またはジペプチド残基であり； $A^2$ は、単結合あるいは左側をN末端とするアミノ酸残基またはジペプチド残基であり； $L^1$ は二価の連結基であり；そして、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  および  $R^6$  は、それぞれ独立に、水素原子、アルキル基またはアラルキル基である。

10 【請求項 5】 式 (I) において、 $L^1$  が、 $-O-$ 、 $-NR^7-$  ( $R^7$  は、水素原子、アルキル基、またはアラルキル基である)、二価の複素環残基、アルキレン基、 $-CO-$ 、フェニレン基およびそれらの組み合わせからなる群より選ばれる二価の連結基である請求の範囲第 4 項に記載のビスホスホン酸誘導体またはその塩。

\* 【請求項 6】 下記式 (II) で表わされるビスホスホン酸誘導体またはその塩：

【化 2】

※ ミノ酸残基またはジペプチド残基であり； $L^{21}$ は、 $-O-$ 、 $-NR^{27}-$ 、二価の複素環残基、アルキレン基、 $-CO-$ 、フェニレン基及びそれらの組み合わせからなる群より選ばれる二価の連結基であり；そして $R^{22}$ 、 $R^{23}$ 、 $R^{24}$ 、 $R^{25}$ 、 $R^{26}$ および $R^{27}$ は、それぞれ独立に、水素原子、アルキル基またはアラルキル基である。

【請求項 8】 アミノ酸残基、またはジペプチド残基が、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニンまたはチロシンの残基あるいはそれらの組み合わせからなる請求の範囲第 4 項乃至第 7 項のいずれか一項に記載のビスホスホン酸誘導体またはその塩。

40 【請求項 9】  $L^1$  が、下記の  $L^2 \sim L^{15}$  からなる群より選ばれる請求の範囲第 4 項に記載のビスホスホン酸誘導体またはその塩：

 $L^2$  : -複素環残基- $L^3$  : -複素環残基-アルキレン- $L^4$  :  $-O-$ 複素環残基- $L^5$  :  $-O-$ アルキレン- $CO-NR^8-$  $L^6$  :  $-NR^9-$ アルキレン- $CO-NR^{10}-$  $L^7$  :  $-O-$ アルキレン- $L^8$  : -複素環残基- $CO-$ アルキレン- $L^9$  : -複素環残基- $CO-O-$ アルキレン-

※ 50

3

$L^{10}$ : -複素環残基-O-CO-アルキレン-

$L^{11}$ : -NR<sup>11</sup>-アルキレン-NR<sup>12</sup>-CO-アルキレン-

$L^{12}$ : -複素環残基-アルキレン-フェニレン-O-アルキレン-

$L^{13}$ : -複素環残基-アルキレン-フェニレン-O-CO-アルキレン-

$L^{14}$ : -複素環残基-アルキレン-フェニレン-O-アルキレン-CO-NR<sup>15</sup>-

$L^{15}$ : -NR<sup>14</sup>-アルキレン-O-CO-アルキレン-

上記各式において、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>、R<sup>11</sup>、R<sup>12</sup>、R<sup>13</sup>およびR<sup>14</sup>は、それぞれ独立に、水素原子、アルキル基またはアラルキル基である。

【請求項10】  $L^{21}$ が、下記の $L^{22}$ ~ $L^{26}$ からなる群より選ばれる請求の範囲第6項に記載のビスホスホン酸誘導体またはその塩:

$L^{22}$ : -複素環残基-

$L^{23}$ : -O-複素環残基-

$L^{24}$ : -O-アルキレン-CO-NR<sup>25</sup>-

$L^{25}$ : -NR<sup>26</sup>-アルキレン-CO-NR<sup>27</sup>-

$L^{26}$ : -O-アルキレン-

上記各式において、R<sup>28</sup>、R<sup>29</sup>およびR<sup>30</sup>は、それぞれ独立に、水素原子、アルキル基またはアラルキル基である。

【請求項11】  $L^{31}$ が、下記の $L^{32}$ ~ $L^{37}$ からなる群より選ばれる請求の範囲第7項に記載のビスホスホン酸誘導体またはその塩:

$L^{32}$ : -複素環残基-

$L^{33}$ : -複素環残基-アルキレン-

$L^{34}$ : -複素環残基-CO-アルキレン-

$L^{35}$ : -複素環残基-CO-O-アルキレン-

$L^{36}$ : -複素環残基-O-CO-アルキレン-

$L^{37}$ : -NR<sup>38</sup>-アルキレン-NR<sup>39</sup>-CO-アルキレン-

$L^{38}$ : -複素環残基-アルキレン-フェニレン-O-アルキレン-

$L^{39}$ : -複素環残基-アルキレン-フェニレン-O-CO-アルキレン-

$L^{40}$ : -複素環残基-アルキレン-フェニレン-O-アルキレン-CO-NR<sup>41</sup>-

$L^{41}$ : -NR<sup>42</sup>-アルキレン-O-CO-アルキレン-

上記各式において、R<sup>38</sup>、R<sup>39</sup>、R<sup>40</sup>およびR<sup>41</sup>は、それぞれ、水素原子、アルキル基またはアラルキル基である。

【請求項12】 二価の複素環残基が、ピペリジン環またはピペラジン環を有する請求の範囲第4項乃至第11項のいずれかの項に記載のビスホスホン酸誘導体またはその塩。

【請求項13】 エポキシコハク酸の部分構造を有し、システインプロテアーゼ阻害活性を示すビスホスホン酸

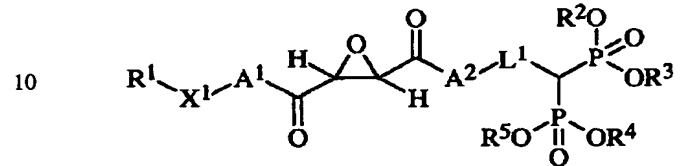
4

誘導体またはその生理学的に許容できる塩を有効成分として含有する骨疾患の治療薬。

【請求項14】 下記式(I)で表わされるビスホスホン酸誘導体またはその生理学的に許容できる塩を有効成分として含有する骨疾患の治療薬:

【化4】

(I)



上記式において、R<sup>1</sup>は、水素原子、アルキル基またはアラルキル基であり; X<sup>1</sup>は、-O-、-NR<sup>6</sup>-または二価の複素環残基であり; A<sup>1</sup>は、単結合あるいは右側をN末端とするアミノ酸残基またはジペプチド残基であり; A<sup>2</sup>は、単結合あるいは左側をN末端とするアミノ酸残基またはジペプチド残基であり; L<sup>1</sup>は二価の連結基であり; そして、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>は、それぞれ独立に、水素原子、アルキル基またはアラルキル基である。

【請求項15】 式(I)において、L<sup>1</sup>が、-O-、-NR<sup>7</sup>- (ここでR<sup>7</sup>は、水素原子、アルキル基、またはアラルキル基である)、二価の複素環残基、アルキレン基、-CO-、フェニレン基およびそれらの組み合わせからなる群より選ばれる二価の連結基である請求の範囲第14項に記載のビスホスホン酸誘導体またはその生理学的に許容できる塩を有効成分として含有する骨疾患の治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なビスホスホン酸誘導体およびそれを用いた骨疾患の治療薬に関するものである。

【0002】

【従来の技術】骨組織は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を繰り返しており、このバランスの上に骨の構造および量が保持されている。しかし、骨吸収が優位な状態になると骨粗鬆症、悪性高カルシウム血症、骨ペーチェット病などの骨疾患を発症する。

【0003】破骨細胞による骨吸収は、ミネラルの溶解(脱灰)と骨基質の分解のステップに分けることができ、骨基質の分解はリソソーム酵素により起こると考えられている。最近の研究では、リソソーム酵素の中で中心的に働いているものはシステインプロテアーゼであるカテプシンLやL類似の酵素であるといわれている(掛川、勝沼、Molecular Medicine, 30(10), 1310-1318(1993) および手塚ほか、J. Biol. Chem., 269, 1106-1109(1994))。また、システインプロテアーゼ阻害剤が骨吸収を抑制することが報告されている(J.M. Delaisse ほ

50

か、Biochem. Biophys. Res. Commun., 125, 441-447 (1984))。そこで、カテプシンLをはじめとするシステインプロテアーゼを阻害する化合物は、骨粗鬆症などの骨疾患の治療に有望であると考えられており、例えば、いくつかのエポキシコハク酸誘導体を骨疾患の治療に用いることが提案されている(特開昭63-284127号公報、特開平2-218610号各公報)。しかしながら、システインプロテアーゼ阻害剤を臨床的に使用した例はなく、その研究は緒に就いたばかりである。

【0004】一方、ビスホスホン酸誘導体は、骨組織に高い親和性を有することが知られている(A. Jung ほか、Calcif. Tissue Res., 11, 269-280(1973))。この点に着目し、骨疾患に対する有用性が確認または期待される化合物にビスホスホネート基を導入することにより、骨以外の他の臓器への影響を軽減させた骨疾患治療剤を創製しようという試みが多くなされている。ビスホスホネート基を導入した化合物の例としては、既に骨粗鬆症治療に使用されているエストロゲン(特開平4-352795号、同5-230086号、同5-286993号、同6-100576号各公報)や抗炎症剤(特開平2-268190号公報)がある。

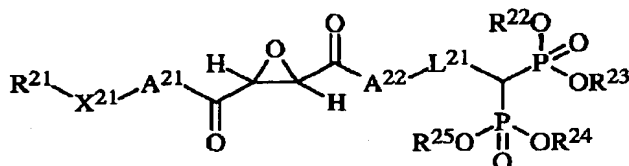
#### 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、骨粗鬆症、悪性高カルシウム血症、骨ペーチェット病等の骨疾患の予防または治療に有用な化合物と薬剤を提供することである。本発明の目的はまた、カテプシンL活性の異常亢進を伴う骨関節炎やリウマチ性関節炎の治療剤として有用な化合物および薬剤を提供することにもある。本発明はまた、カテプシンB及びLが関与する筋ジストロフィーや筋萎縮症などの疾患の治療に有用な化合物を提供することも、その目的とする。

#### 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題の解決のために鋭意研究した結果、システインプロテアーゼ阻害作用を有するエポキシコハク酸誘導体に骨親和性のあるビスホスホネート基を導入したビスホスホン酸誘導体またはその塩が、骨疾患の予防または治療に有用であることを見出し発明を完成した。本発明は、エポキシコハク酸の部分構造を有し、システインプロテアーゼ阻害活性を示すビスホスホン酸誘導体またはその塩を

#### (II)



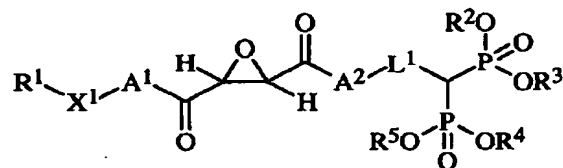
【0011】(上記式において、R<sup>21</sup>は、アルキル基またはアラルキル基であり；X<sup>21</sup>は、-NR<sup>20</sup>-または二価の複素環残基であり；A<sup>21</sup>は、単結合あるいは右側をN末端とするアミノ酸残基またはジペプチド残基であ

\* 提供する。このビスホスホン酸誘導体において、エポキシコハク酸のカルボニル基が連結基でビスホスホン酸構造に結合していることが好ましい。上記のビスホスホン酸誘導体には、物理化学的変換あるいは生体内で代謝を受けて、システインプロテアーゼ阻害活性を示すエポキシコハク酸誘導体を放出するエポキシコハク酸の部分構造と連結基の部分構造とを有するものも含まれる。本発明は特に、下記式(I)で表わされるビスホスホン酸誘導体またはその塩を提供する。

#### 10 【0007】

#### 【化5】

#### (I)



【0008】(上記式において、R<sup>1</sup>は、水素原子、アルキル基またはアラルキル基であり；X<sup>1</sup>は、-O-、-NR<sup>6</sup>-または二価の複素環残基であり；A<sup>1</sup>は、単結合あるいは右側をN末端とするアミノ酸残基またはジペプチド残基であり；A<sup>2</sup>は、単結合あるいは左側をN末端とするアミノ酸残基またはジペプチド残基であり；L<sup>1</sup>は二価の連結基であり；そして、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、およびR<sup>6</sup>は、それぞれ独立に、水素原子、アルキル基またはアラルキル基である。)

なお、上記のアルキル基、アラルキル基、二価の複素環残基、アルキレン基およびフェニレン基は置換基を有してもよい。上記の式(I)において、L<sup>1</sup>が、-O-、-NR<sup>7</sup>- (ここでR<sup>7</sup>は、水素原子、アルキル基、またはアラルキル基である)、二価の複素環残基、アルキレン基、-CO-、フェニレン基およびそれらの組み合わせからなる群より選ばれる二価の連結基であることが好ましい。

【0009】なかでも、下記式(II)または(III)で表わされるビスホスホン酸誘導体またはその塩が特に有効である。

#### 【0010】

#### 【化6】

※り；A<sup>22</sup>は、単結合あるいは左側をN末端とするアミノ酸残基であり；L<sup>21</sup>は、-O-、-NR<sup>27</sup>-、二価の複素環残基、アルキレン基、-CO-、フェニレン基、及びそれらの組み合わせからなる群より選ばれる二価の連

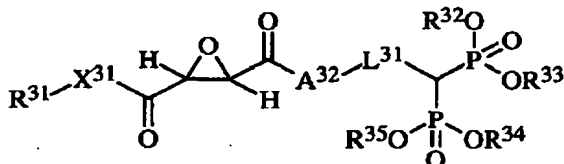
結基であり；そして、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ および $R^7$ は、それぞれ独立に、水素原子、アルキル基またはアラルキル基である。）

なお、上記のアルキル基、アラルキル基、二価の複素環残基、アルキレン基およびフェニレン基は置換基を有してもよい。

【0012】

【化7】

(III)



【0013】（上記式において、 $R^3$ は、水素原子、アルキル基またはアラルキル基であり； $X^3$ は、 $-O-$ または $-NR^3-$ であり； $A^3$ は、単結合あるいは左側をN末端とするアミノ酸残基またはジペプチド残基であり； $L^3$ は、 $-O-$ 、 $-NR^3-$ 、二価の複素環残基、アルキレン基、 $-CO-$ 、フェニレン基及びそれらの組み合わせからなる群より選ばれる二価の連結基であり；そして $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ および $R^7$ は、それぞれ独立に、水素原子、アルキル基またはアラルキル基である。なお、上記のアルキル基、アラルキル基、二価の複素環残基、アルキレン基およびフェニレン基は置換基を有してもよい。

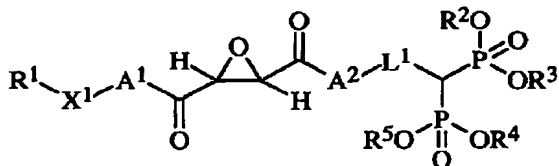
【0014】

【発明の実施の形態】本発明は、まず、エポキシコハク酸の部分構造を有し、システインプロテアーゼ阻害活性を示すビスホスホン酸誘導体またはその塩にある。このビスホスホン酸誘導体において、そのエポキシコハク酸のカルボニル基が連結基でビスホスホン酸構造に結合していることが好ましい。上記のビスホスホン酸誘導体は、物理化学的変換あるいは生体内で代謝を受けて、システインプロテアーゼ阻害活性を示すエポキシコハク酸誘導体を放出するエポキシコハク酸の部分構造と連結基の部分構造とを有するものも含む。上記のエポキシコハク酸の部分構造を有し、システインプロテアーゼ阻害活性を示すビスホスホン酸誘導体またはその塩の代表例として、下記式（I）で表わされるビスホスホン酸誘導体を挙げるので、この化合物を例にとって、本発明を説明する。

【0015】

【化8】

(I)



\* 【0016】上記の式（I）において、 $R^1$ は、水素原子、アルキル基またはアラルキル基である。アルキル基の炭素原子数（置換基を有する場合には、置換基を含めた総炭素原子数）は、1乃至30であることが好ましく、1乃至20であることがさらに好ましく、1乃至15であることが最も好ましい。アルキル基は環状構造を有してよいが、環状アルキル基よりも鎖状アルキル基の方が好ましい。鎖状アルキル基は、分岐を有していてもよい。これらのアルキル基は置換基を有してもよい。アルキル基の置換基の例には、ハロゲン原子およびヒドロキシル基が含まれる。アラルキル基の炭素原子数（置換基を有する場合には、置換基を含めた総炭素原子数）は、7乃至40であることが好ましく、7乃至30であることがさらに好ましく、7乃至20であることが最も好ましい。アラルキル基の例には、ベンジル、フェネチルおよびジフェニルメチルが含まれる。ジフェニルメチルが特に好ましい。アラルキル基は置換基を有してもよい。アラルキル基の置換基の例には、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、アルキル基（炭素原子数1～10）およびアルコキシ基（炭素原子数1～10）が含まれる。

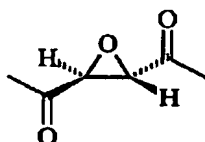
【0017】式（I）において $X^1$ は、 $-O-$ 、 $-NR^6-$ 又は二価の複素環残基であることが好ましい。ここで、 $R^6$ は、水素原子、アルキル基（炭素原子数1～10）またはアラルキル基（炭素原子数7～20）である。なかでも、水素原子が特に好ましい。 $R^6$ のアルキル基の炭素原子数（置換基を有する場合には、置換基を含めた総炭素原子数）は、1乃至10であることが好ましく、1乃至6であることがさらに好ましく、1乃至4であることが最も好ましい。鎖状アルキル基が好ましい。鎖状アルキル基は分岐を有していてもよい。なお、アルキル基は置換基を有してもよい。アルキル基の置換基の例には、ハロゲン原子およびヒドロキシル基が含まれる。 $R^6$ のアラルキル基の炭素原子数（置換基を有する場合には、置換基を含めた総炭素原子数）は7乃至20であることが好ましく、7乃至15であることがさらに好ましく、7乃至10であることが最も好ましい。アラルキル基の例には、ベンジルおよびフェネチルが含まれる。アラルキル基は置換基を有してもよい。アラルキル基の置換基の例には、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、アルキル（炭素原子数1～10）およびアルコキシ基（炭素原子数1～10）が含まれる。

【0018】二価の複素環残基は、4員乃至7員の複素環を有することが好ましく、5員または6員の複素環を有することがさらに好ましい。複素環は、ヘテロ原子として窒素を有することが好ましい。複素環は、炭素と窒素のみから構成されることがさらに好ましい。複素環は飽和していることが好ましい。特に好ましい複素環としては、ピペラジン環およびピペリジン環を挙げることができる。複素環が炭素と窒素のみから構成される場合、複素環残基の二つの遊離原子価のうち、少なくとも一方

は窒素に存在することが好ましい。炭素と窒素のみから構成される6員の複素環の場合は、環の1位と4位とに複素環残基の遊離原子価が存在することが好ましい。なお、複素環残基は置換基を有してもよい。複素環残基の置換基の例には、前記のようなハロゲン原子、ヒドロキシル基、アルキル基、アリール基およびアルコキシ基が含まれる。

【0019】前記式(1)において、A<sup>1</sup>は、単結合、あるいは右側をN末端とするアミノ酸残基またはジペプチド残基である。単結合の場合は、上記X<sup>1</sup>が、直接カルボニル(オキシラン環に結合しているカルボニル)に結合する。アミノ酸残基およびジペプチド残基は、天然のL型のアミノ酸から誘導されることが好ましい。グリ \* 10

(T1)



【0021】前記の式(1)において、A<sup>2</sup>は、単結合あるいは左側をN末端とするアミノ酸残基またはジペプチド残基である。単結合の場合は、後述するL<sup>1</sup>が、直接カルボニル(オキシラン環に結合しているカルボニル)に結合する。アミノ酸残基およびジペプチド残基は、天然のL型のアミノ酸から誘導されることが好ましい。グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニンまたはチロシンの残基、あるいはそれらの組み合わせが特に好ましい。ジペプチド残基の場合は、異なるアミノ酸残基を組み合わせてもよい。

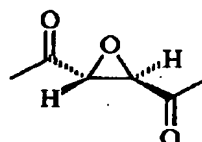
【0022】式(1)において、L<sup>1</sup>は、-O-、-N R<sup>1</sup>、二価の複素環残基、アルキレン、-COO-、フェニレンおよびそれらの組み合わせからなる群より選ばれる二価の連結基であることが好ましい。上記のR<sup>1</sup>は、水素原子、アルキル基またはアラルキル基である。なかでも、水素原子が特に好ましい。R<sup>1</sup>のアルキル基の炭素原子数(置換基を有する場合には、置換基を含めた総炭素原子数)は、1乃至10であることが好ましく、1乃至6であることがさらに好ましく、1乃至4であることが最も好ましい。鎖状アルキル基が好ましい。鎖状アルキル基は分岐を有していてもよい。なお、アルキル基は置換基を有してもよい。アルキル基の置換基の例には、ハロゲン原子およびヒドロキシル基が含まれる。R<sup>1</sup>のアラルキル基の炭素原子数(置換基を有する場合には、置換基を含めた総炭素原子数)は、7乃至20であることが好ましく、7乃至15であることがさらに好ましく、7乃至10であることが最も好ましい。このアラルキル基の例には、ベンジルおよびフェネチルが含まれる。なお、アラルキル基は置換基を有してもよい。アラルキル基の置換基の例には、前記のようなハロゲン原子、ヒドロキシル基、アルキル基およびアルコキ ※50

\* シン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニンまたはチロシンの残基或はそれらの組み合わせが特に好ましい。ジペプチド残基の場合は、異なるアミノ酸残基を組み合わせてもよい。前記式(1)に示すオキシラン環の二つの炭素は、共に不斉炭素原子である。式(1)は、オキシラン環に結合した二つのカルボニル基がトランス型であることを示す。すなわち、本発明のビスホスホン酸誘導体は、下記の(T1)または(T2)に示される光学異性体のいずれか、あるいはこれらの混合物である。なかでも、(T1)の光学異性体の方が好ましい。

【0020】

【化9】

(T2)



※シ基が含まれる。

【0023】二価の複素環残基は、4員乃至7員の複素環を有することが好ましく、5員または6員の複素環を有することがさらに好ましい。複素環は、ヘテロ原子として窒素を有することが好ましい。複素環は、炭素と窒素のみから構成されることがさらに好ましい。複素環は飽和していることが好ましい。特に好ましい複素環としては、ピペラジン環およびピペリジン環を挙げることができる。複素環が炭素と窒素のみから構成される場合、複素環残基の二つの遊離原子価のうち、少なくとも一方は窒素に存在することが好ましい。炭素と窒素のみから構成される6員の複素環の場合は、環の1位と4位とに複素環残基の遊離原子価が存在することが好ましい。なお、複素環残基は置換基を有してもよい。複素環残基の置換基の例には、前記のようなハロゲン原子、ヒドロキシル基、アルキル基、アリール基およびアルコキシ基が含まれる。

【0024】アルキレン基の炭素原子数(置換基を有する場合には、置換基を含めた総炭素原子数)は、1乃至30であることが好ましく、1乃至20であることがさらに好ましく、1乃至15であることが最も好ましい。アルキレン基は環状構造を有してよいが、環状アルキレン基よりも鎖状アルキレン基の方が好ましい。鎖状アルキレン基は、分岐を有していてもよい。なお、アルキレン基は置換基を有してもよい。アルキレン基の置換基の例には、前記のようなハロゲン原子、ヒドロキシルおよびアリールが含まれる。フェニレン基は置換基を有してもよい。フェニレンの置換基の例には、前記のようなハロゲン原子、ヒドロキシル、アルキルおよびアルコキシが含まれる。

【0025】L<sup>1</sup>の例を、下記のL<sup>2</sup>~L<sup>15</sup>に示す。

【0027】式(1)において、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  および  $R^5$  は、それぞれ独立に、水素原子、アルキル基、またはアラルキル基である。水素原子が特に好ましい。 $R^2 \sim R^5$  のアルキル基の炭素原子数（置換基を有する場合には、置換基を含めた総炭素原子数）は、1乃至10であることが好ましく、1乃至6であることがさらに好ましく、1乃至4であることが最も好ましい。鎖状アルキル基が好ましい。鎖状アルキル基は分岐を有していてもよい。 $R^2 \sim R^5$  のアラルキル基の炭素原子数（置換基を有する場合には、置換基を含めた総炭素原子数）は、7乃至20であることが好ましく、7乃至15であることがさらに好ましく、7乃至10であることが最も好ましい。アラルキル基の例には、ベンジルおよびフェネチルが含まれる。なお、アラルキル基は置換基を有してもよい。アラルキルの置換基の例には、前記のようなハロゲン原子、ヒドロキシル基、アルキル基およびアルコキシ基が含まれる。

【化 10】

$$\begin{array}{c} \text{R}^{21}-\text{X}^{21}-\text{A}^{21}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}_2\text{H}_2\text{C}(=\text{O})-\text{A}^{22}-\text{L}^{21}-\text{C}(\text{R}^{22}\text{O})(\text{OR}^{23})\text{P}(=\text{O})(\text{R}^{25}\text{O})(\text{OR}^{24}) \end{array}$$

上記各式において、 $R^{28}$ 、 $R^{29}$ および $R^{30}$ は、それぞれ

\* 好ましい。R<sup>3</sup>のアルキル基およびアラルキル基の詳細は、前述した式(Ⅰ)のR<sup>1</sup>と同様である。上記二価の複素環残基、アルキレン基およびフェニレン基の詳細も、前述した式(Ⅰ)のL<sup>1</sup>と同様である。

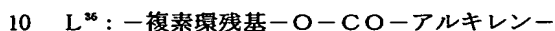
【0034】式(II)において、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ および $R^5$ は、それぞれ、水素原子、アルキルまたはアラルキル基である。水素原子が特に好ましい。アルキル基およびアラルキル基の詳細は、前述した式(I)の $R^1 \sim R^6$ と同様である。

L<sup>32</sup>: —複素環殘基—

L<sup>33</sup>: -複素環残基-アルキレン-

L<sup>34</sup>: -複素環残基-CO-アルキレン-

L<sup>35</sup>: -複素環残基-CO-O-アルキレン-


$$L^{37}: -NR^{38}-\text{アルキレン}-NR^{39}-CO-\text{アルキレン}-$$

L<sup>38</sup>: -複素環残基-アルキレン-フェニレン-O-アルキレン-

L<sup>39</sup>: -複素環残基-アルキレン-フェニレン-O-C  
O-アルキレン-

L<sup>40</sup>: -複素環残基-アルキレン-フェニレン-O-アルキレン-CO-NR<sup>40</sup>-

$$L^{41}: -NR^{41}-\text{アルキレン}-O-CO-\text{アルキレン}-$$

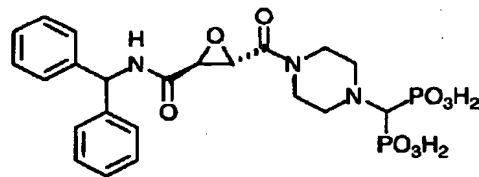
【0040】上記各式において、 $R^{38}$ 、 $R^{39}$ 、 $R^{40}$ およ

びR<sup>4</sup>は、それぞれ、水素原子、アルキル基またはアラルキル基である。水素原子が特に好ましい。アルキル基およびアラルキル基の詳細については、前述した式(I)のR<sup>1</sup>と同様である。また、複素環残基、アルキレン基、およびフェニレン基の詳細も、前述した式(I)のL<sup>1</sup>と同様である。式(III)において、R<sup>22</sup>、R<sup>23</sup>、R<sup>24</sup>およびR<sup>25</sup>は、それぞれ、水素原子、アルキル基またはアラルキル基である。水素原子が特に好ましい。アルキル基およびアラルキル基の詳細は、前述した式(I)のR<sup>2</sup>~R<sup>5</sup>と同様である。

【0041】以下に、本発明のビスホスホン酸誘導体の具体例を示す。

【化 1 2】

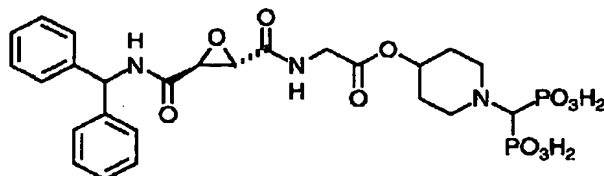
(1)



【 0 0 4 3 】

【化 1 3】

(2)



【 0 0 4 4 】

【化 1 4】

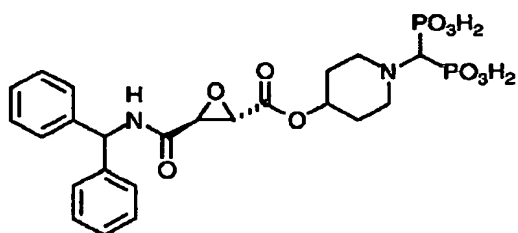


(9)

16

(3)

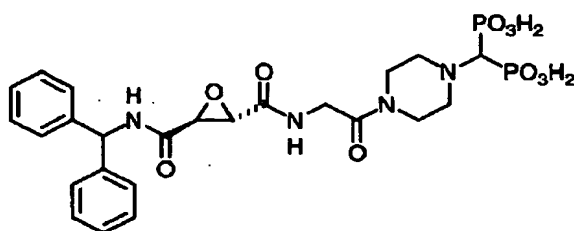
15



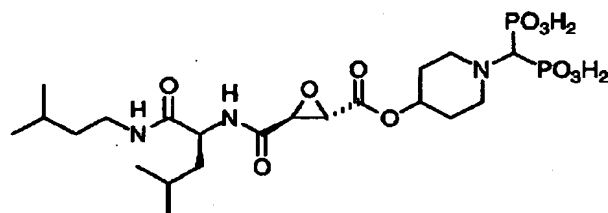
【0045】

【化15】

(4)

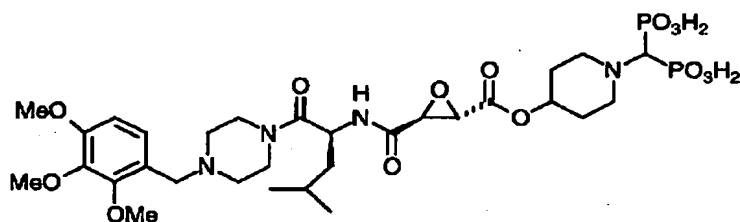


(6)



【0048】

(7)

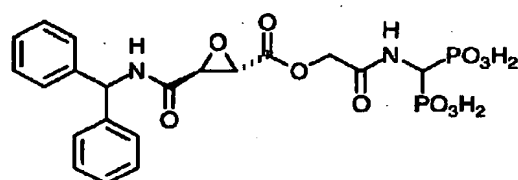


【化18】

【0049】

【化19】

(8)



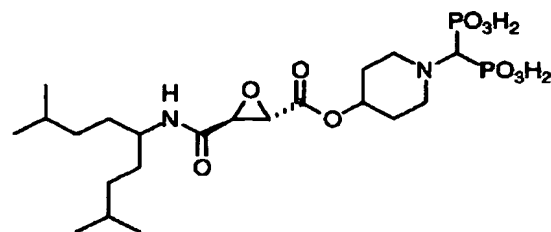
【0050】

【化20】

\* 【0046】

【化16】

(5)

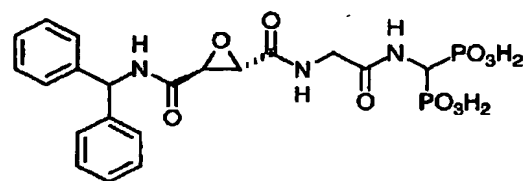


\* 10

【0047】

【化17】

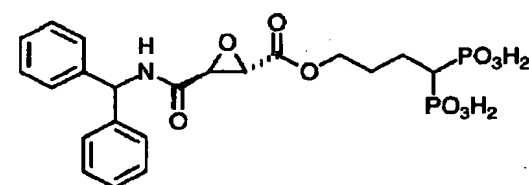
(9)



※ 【0051】

【化21】

(10)



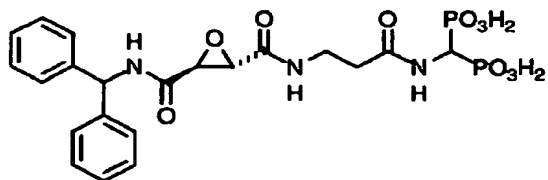
※

17

【0052】

【化22】

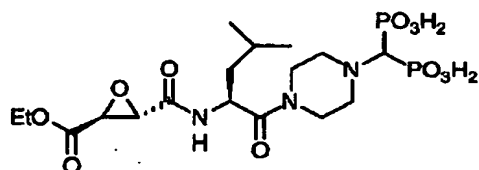
(11)



【0053】

【化23】

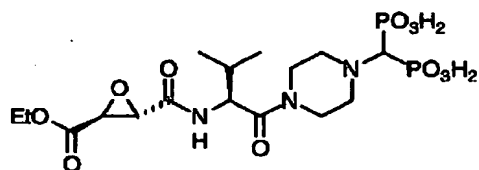
(12)



【0054】

【化24】

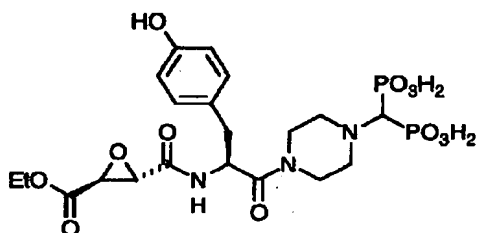
(13)



【0055】

【化25】

(14)



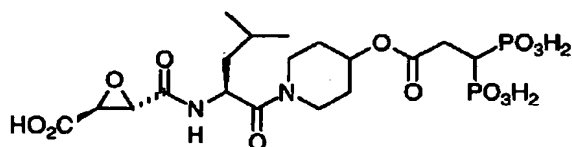
【0056】

(19)

【0061】

【化31】

(20)

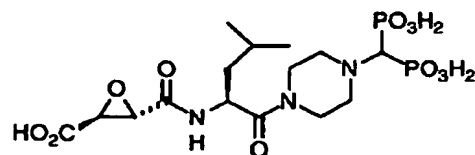


【0062】

18

【化26】

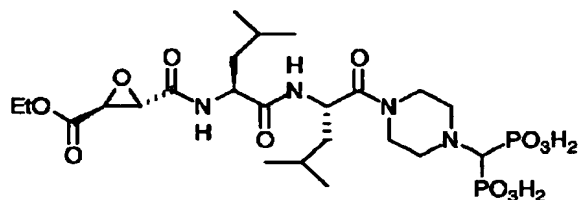
(15)



【0057】

【化27】

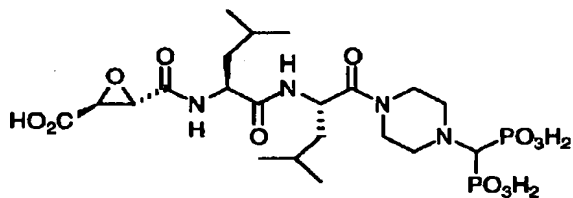
10 (16)



【0058】

【化28】

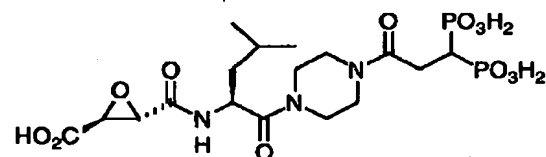
(17)



【0059】

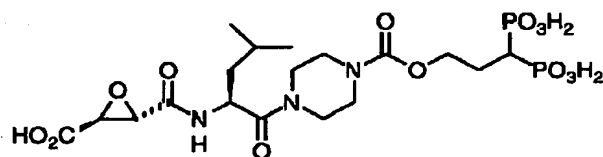
【化29】

(18)



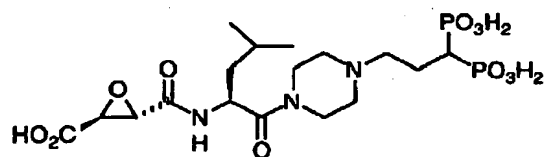
【0060】

【化30】



【化32】

(21)



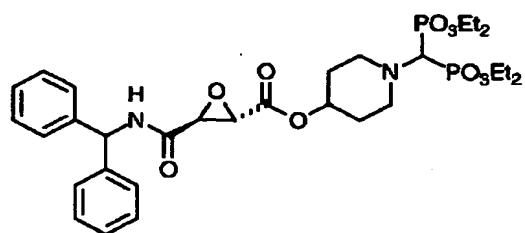
【0063】

【化33】



21

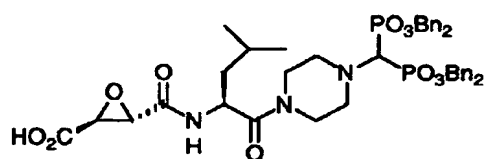
(30)



【0072】

【化42】

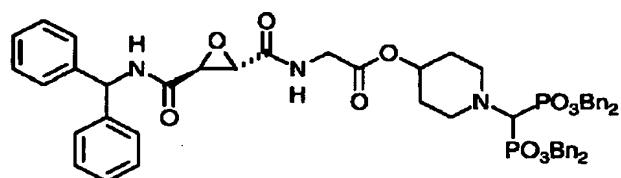
(31)



【0073】

【化43】

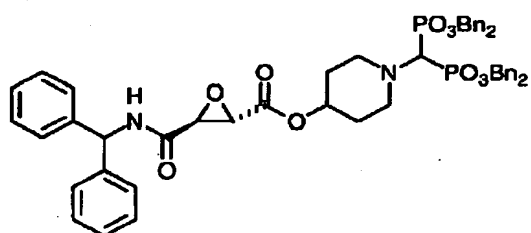
(34)



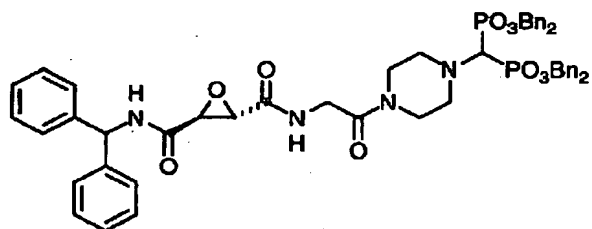
【0076】

【化46】

(35)



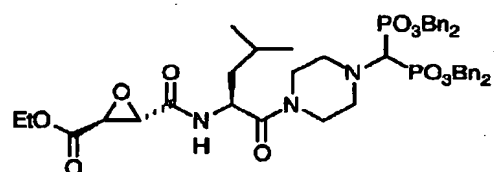
(36)



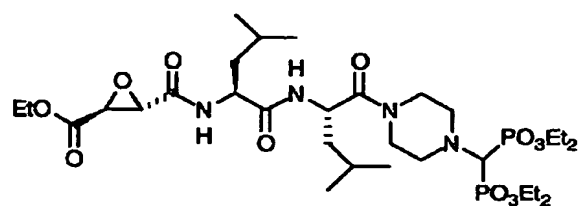
【0078】

【化48】

(37)



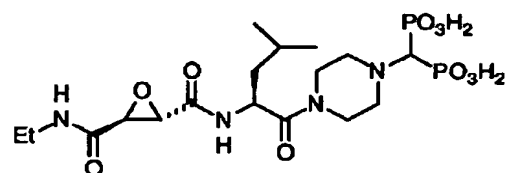
(32)



\* 【0074】

【化44】

10 (33)



【0075】

【化45】

\*

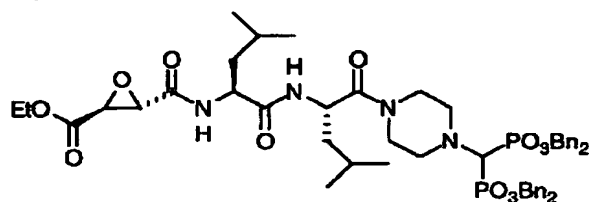
※ 【0077】

※ 【化47】

★ 【0079】

★ 【化49】

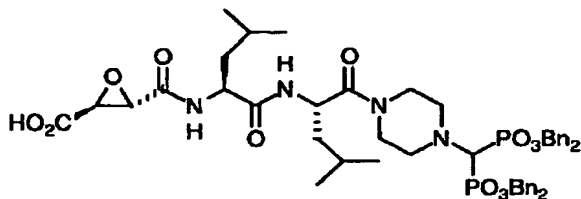
(38)



【0080】

【化50】

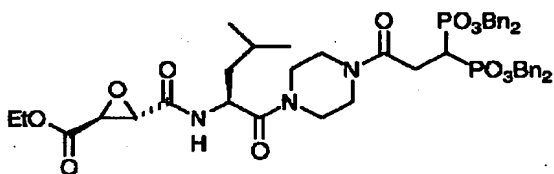
(39)



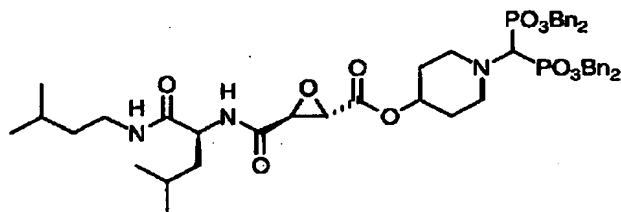
【0081】

【化51】

(40)



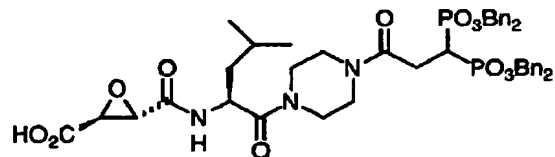
(42)



\* 【0082】

【化52】

10 (41)



【0083】

【化53】

\*

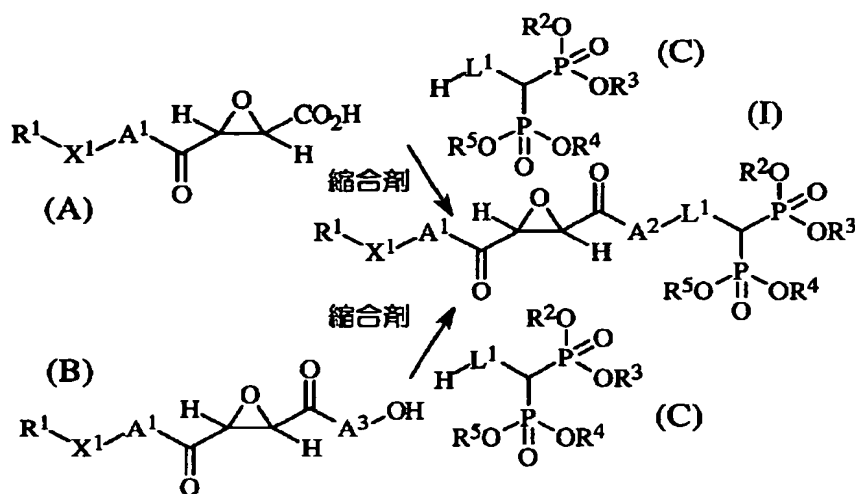
【0084】前記の各式において、Meはメチル、Etはエチル、そしてBnはベンジルを示す。本発明のビスホスホン酸誘導体は、塩として用いてもよい。塩を構成する場合は、ビスホスホン酸と塩基とが塩を形成してもよいし、複素環残基やアミノ基が酸と塩を形成してもよい。ビスホスホン酸は、部分的な塩（モノー、ジーまたはトリー）を形成してもよい。塩基のカチオンの例としては、アルカリ金属イオン（例、ナトリウム、カリウム）及びアルカリ土類金属イオン（例、カルシウム）を挙げることができる。酸としては、生理学的に許容でき ※

※る無機酸（例、塩酸、硫酸）および有機酸（例、酢酸）が利用できる。本発明のビスホスホン酸誘導体の代表的な合成方法について説明する。前記の式（I）のビスホスホン誘導体は、下記化合物（A）または（B）に化合物（C）を反応させることにより合成することができる。なお、化合物（A）は、式（I）のA<sup>2</sup>が単結合である場合を意味する。

40 【0085】

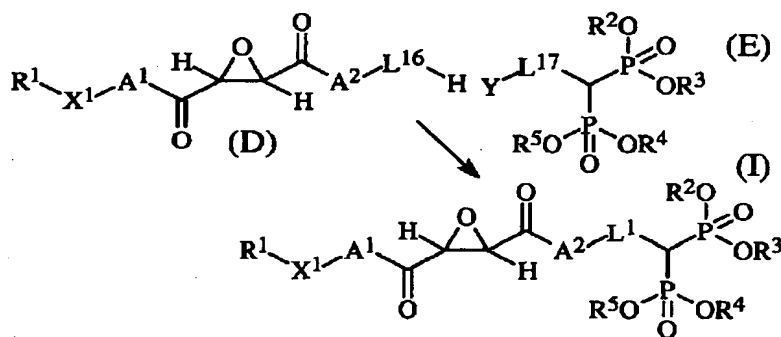
【化54】

## 反応①



【0086】上記の式において、 $R^1$ 、 $X^1$ 、 $A^1$ 、 $A^2$ 、 $L^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  および  $R^5$  は、前述した式 (I) と同様の定義を有する。 $A^3$  は、左側をN末端とするアミノ酸残基またはジペプチド残基である。上記反応は、縮合剤の存在下で実施する。縮合剤の例としては、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、N-ヒドロキシコハク酸イミド/N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール/塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドおよびN, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド/4-ジメチルアミノピリジンを挙げる \*

## 反応②



【0088】上記の式において、 $R^1$ 、 $X^1$ 、 $A^1$ 、 $A^2$ 、 $L^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  および  $R^5$  は、前述した式 (I) と同様の定義を有する。 $L^{16}$ は、左右の末端の原子が酸素または窒素である二価の連結基であり、 $L^{16}$ の右側の末端の原子が酸素の場合、化合物 (D) はアルコール体またはカルボン酸体である。 $L^{16}$ の右側の原子が窒素の場合、化合物 (D) はアミン体である。Yはハロゲン、ヒドロキシル、カルボキシルおよびアミノのいずれかの基である。 $L^{17}$ は、 $L^{16}$ との結合により  $L^1$  を形

\* ことができる。また、上記反応において化合物 (C)

の  $L^1$  の左側の末端の原子は酸素または窒素である。酸素の場合、化合物 (C) はアルコール体であり、化合物 (A) または (B) のカルボキシル基との反応によりエステルを生成する。窒素の場合は化合物 (C) はアミン体であり、化合物 (A) または (B) のカルボキシル基との反応によりアミドを生成する。ビスホスホン酸誘導体 (I) は、下記化合物 (D) に化合物 (E) を反応させることによっても合成することができる。

【0087】

【化55】

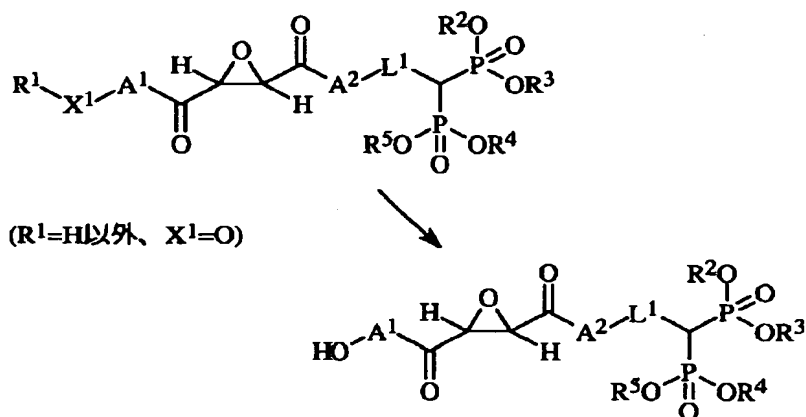
※成するために必要な二価の連結基である。

【0089】本発明のビスホスホン酸誘導体 (I) の中で、 $X^1$  が  $-O-$  である場合には、上記の反応またはを実施後、エタノール中水酸化カリウムを作用させて、次に酸性化する方法、または接触還元 ( $R^1$  がベンジルの場合) により  $R^1$  を水素にすることができる。

【0090】

【化56】

## 反応③



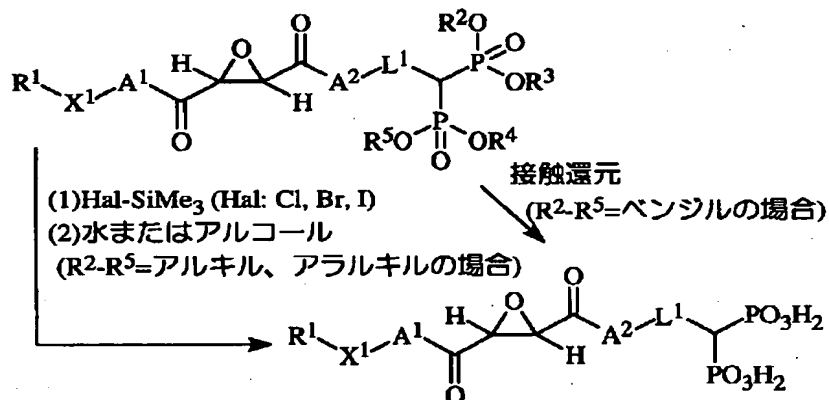
【0091】また、R²、R³、R⁴ および R⁵ が水素でない場合には、前記の反応またはを実施後、下記のようにして R²、R³、R⁴ および R⁵ を水素にする \*

\* ことができる。

【0092】

【化57】

## 反応④



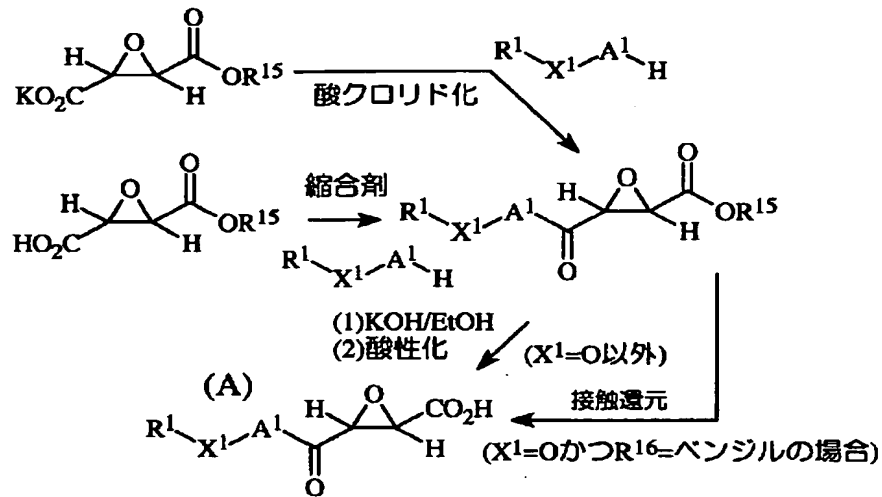
【0093】さらにまた、ビスホスホン酸のジナトリウム塩は、R²、R³、R⁴ 及び R⁵ が水素であるビスホスホン酸誘導体 (I) にナトリウム塩化剤 (例、炭酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウム) を作用させることにより得ることができる。このとき、X¹ が -O- で、かつ R¹ が水素である場合には、カルボン酸もナトリウム塩として得られる。なお、化合物 (A)、(B) および \*

※ (D) は、特開昭 55-115878 号、同 55-47668 号、同 57-169478 号各公報記載の方法と同様の方法で合成することができる。具体的な反応を以下に示す。

【0094】

【化58】

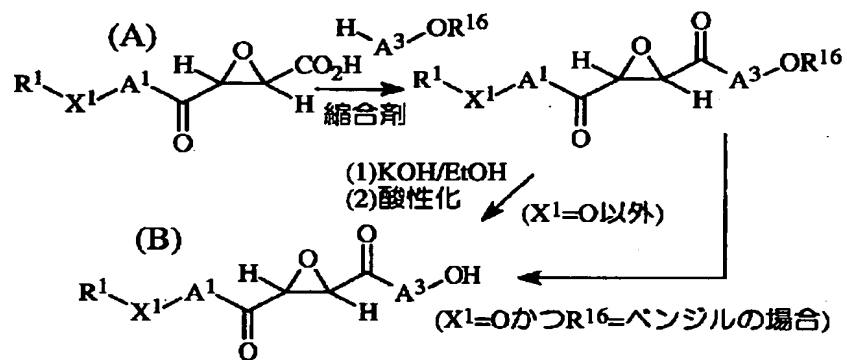
## 反応⑤



【0095】

【化59】

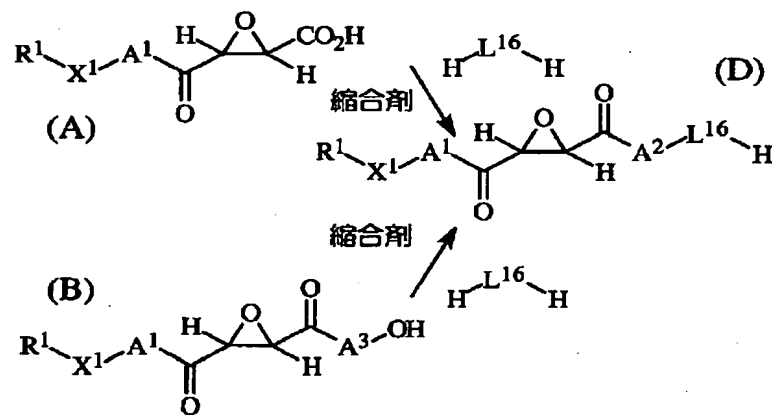
## 反応⑥



【0096】

【化60】

## 反応⑦



【0097】上記式において、R<sup>1</sup>、X<sup>1</sup>、A<sup>1</sup>、A<sup>2</sup>、L<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>は、前述した式(1)と同様の定義を有する。R<sup>15</sup>およびR<sup>16</sup>は保護基で、具体的にはアルキルまたはアラルキルである。ここで使用される結合剤の例は、前記の結合剤と同様である。

【0098】本発明のビスホスホン酸誘導体の薬理作用 \* 50

\* について説明する。本発明のビスホスホン酸誘導体は、チオールプロテアーゼ阻害作用を有するエポキシコハク酸誘導体に、骨親和性のあるビスホスホネート基を導入した化学構造を有する。チオールプロテアーゼには、カテプシンLやBあるいはカルパインが含まれる。従って、本発明のビスホスホン酸誘導体およびその生理学的に許容できる塩は、これらのプロテアーゼが関与する疾



患に対して、薬理作用が期待できる。

【0099】カテプシンLが関与する疾患には、従来の技術で述べたように、骨粗鬆症、悪性高カルシウム血症や骨ペーチェット病のような骨疾患が含まれる。従って、本発明のビスホスホン酸誘導体およびその生理学的に許容できる塩は、これらの骨疾患の予防薬あるいは治療薬として有用である。カテプシンLが関節軟骨を構成するコラーゲンのII型、IX型およびXI型を中性領域で分解することが報告されている (FEBS Lett. 269, 189-193 (1990))。従って、本発明のビスホスホン酸誘導体およびその生理学的に許容できる塩は、カテプシンL活性の異常亢進を伴う骨疾患である骨関節炎あるいはリウマチ性関節炎に対しても有効であることが期待できる

(特開平5-178757号公報参照)。本発明の化合物は、カテプシンB阻害剤としても優れた作用を示す。また、カテプシンBなどの、カテプシンL以外のチオールプロテアーゼが関与する疾患としては、筋ジストロフィーや筋萎縮症 (カテプシンB、カルパインが関与)、アルツハイマー病 (カルパインが関与)、神経細胞の脱髄によって起こるとされる疾患、例えば、多発性硬化症や末端神経のニューロパシー (カルパインが関与)、白内障 (カルパインが関与)、アレルギー疾患 (チオールプロテアーゼが関与)、劇症肝炎 (カルパインが関与)、乳癌、前立腺癌や前立腺肥大症 (カルパインが関与)、癌の増殖や転移 (カテプシンB、カルパインが関与) あるいは血小板の凝集 (カルパインが関与) がある (特開平6-239835号公報参照)。従って、本発明の化合物は、これらの疾患の治療や予防に有効であると考えられる。本発明のビスホスホン酸誘導体およびその生理学的に許容できる塩は、以上の疾患の予防薬あるいは治療薬としても有用であることが期待でき、特に骨粗鬆症、悪性高カルシウム血症、骨ペーチェット病等の骨疾患の予防または治療薬として有用である。本発明のビスホスホン酸誘導体の投与方法は、経口投与でも非経口投与でもよい。経口投与剤の剤型としては、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤およびシロップ剤が挙げられる。非経口投与の方法としては、粘膜投与、体表投与、血管投与および組織内投与がある。粘膜投与の場合は、点眼剤、吸入剤、噴霧剤あるいは座剤として使用する。体表投与の場合は、軟膏剤として使用する。血管投与および組織内投与の場合は、注射剤として使用する。上記経口投与剤の製造は、通常の賦形剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、色素や希釈剤を用いて行なうことができる。賦形剤としては、ブドウ糖や乳糖が一般に使用される。崩壊剤の例には、澱粉およびカルボキシメチルセルロースカルシウムが含まれる。滑沢剤としては、ステアリン酸マグネシウムおよびタルクが挙げられる。結合剤としては、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンおよびポリビニルアルコールが用いられる。非経口投与製剤も通常の方法で製造できる。例えば、注射剤の場合、通常の注射

用蒸留水、生理食塩水あるいはリンゲル液を用いればよい。本発明のビスホスホン酸誘導体の投与量は、通常成人において、注射剤で一日0.01乃至100mg、経口投与で一日0.1乃至1gである。もちろん、投与量は、年齢、人種、症状などに応じて増減する。

#### 【0100】

##### 【実施例】

##### 実施例1

10 [4-[(2S, 3S)-3-ジフェニルメチルカルバモイルオキシラン-2-カルボニル]-1-ピペラジニル]メチレンビスホスホン酸テトラベンジル化合物例(29)

【0101】(1-1) 1-(*t*-ブトキシカルボニル)-4-ホルミルピペラジンの合成

1-ホルミルピペラジン (3.42g, 30.0ミリモル) をテトラヒドロフラン (15mL) と水 (15mL) との混合溶媒に溶解させ、氷冷下にトリエチルアミン (3.64g, 36.0ミリモル) を加え、次に二炭酸ジ-*t*-ブチル (7.85g, 36.0ミリモル) を20分間かけて滴下した。氷冷下で1.5時間攪拌後、減圧下にテトラヒドロフランを留去し、残留物に酢酸エチル (45mL) を加えた。有機層を分取し、10%クエン酸水溶液、飽和重曹水及び飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、得られた白色固体に*n*-ヘキサン (30mL) を加えて室温で30分間激しく攪拌し、濾過、*n*-ヘキサンで洗浄、乾燥することにより白色粉末として標題化合物を得た (5.24g)。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

30 1.48 (9H, s)  
3.3~3.6 (8H, m)  
8.08 (1H, s)

【0102】(1-2) [4-(*t*-ブトキシカルボニル)-1-ピペラジニル]メチレンビスホスホン酸テトラベンジルの合成

上記(1-1)で得た化合物 (1.07g, 5.0ミリモル) の無水テトラヒドロフラン (THF) (10mL) 溶液を-5℃に冷却し、オキサリルクロリド (0.43mL, 5.0ミリモル) を滴下し、室温で4時間攪拌した。反応混合物を-10℃に冷却し、亜リン酸ジベンジルのナトリウム塩のテトラヒドロフラン懸濁液 [60%水素化ナトリウム (0.50g, 12.5ミリモル) の無水THF (8mL) 懸濁液に室温で亜リン酸ジベンジル (4.2g, 16ミリモル) を滴下し、室温で3時間攪拌して調製] を内温が5℃を越えないように滴下した。-10℃で0.5時間、次に室温で1時間攪拌後、反応混合物を減圧濃縮し、残留物に酢酸エチル及び水を加えた。有機層を分取し、水層を酢酸エチルで抽出し、有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒留去後、残留物を中圧

33

シリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン/酢酸エチル=1/2) で精製し、白色結晶粉末として標題化合物を得た (597mg)。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

- 1. 43 (9H, s)
- 2. 95 (4H, m)
- 3. 29 (4H, m)
- 3. 43 (1H, t, J=25Hz)
- 5. 0~5. 1 (8H, m)
- 7. 2~7. 4 (20Hz, m)

【0103】(1-3) (1-ピペラジニル) メチレンビスホスホン酸テトラベンジル p-トルエンスルホン酸塩の合成

上記(1-2)で得た化合物(2.16g, 3.00ミリモル)のエーテル(0mL)懸濁液にp-トルエンスルホン酸・1水和物(1.14g, 6.0ミリモル)を加え室温で攪拌した。3日後、析出物を濾取し、エーテルで数回洗浄、減圧乾燥し、標題化合物をそのモノ脱ベンジル体[(1-ピペラジニル)メチレンビスホスホン酸トリベンジル p-トルエンスルホン酸塩]との混合物(66:34)として得た(白色粉末、1.60, 標題化合物の含量:1.11g, モノ脱ベンジル体の含量:0.48g)。

FAB MS (M/z, 相対強度)

621 ([M+H]<sup>+</sup>、標題化合物(遊離塩基), 22)

531 ([M+H]<sup>+</sup>、モノ脱ベンジル体(遊離塩基), 7)

359 ([M-PO<sub>3</sub>Bn<sub>2</sub>]<sup>+</sup>、標題化合物(遊離塩基), 94)

269 ([M-PO<sub>3</sub>Bn<sub>2</sub>]<sup>+</sup>、モノ脱ベンジル体(遊離塩基), 32)

【0104】(1-4) (2S, 3S)-3-ジフェニルメチルカルバモイルオキシラン-2-カルボン酸エチルの合成

窒素雰囲気下、(2S, 3S)-3-エトキシカルボニルオキシラン-2-カルボン酸カリウム(566mg, 2.0ミリモル)を乾燥エーテル(7mL)に懸濁させ、氷冷下 オキサリクロリド(0.19mL, 2.2ミリモル)の乾燥エーテル(2mL)溶液を滴下した。室温で1時間攪拌後、氷冷下アミノジフェニルメタン(0.69mL, 4.0ミリモル)の乾燥エーテル(2mL)溶液を滴下し、さらに室温で1時間攪拌した。沈殿物を濾別し、残渣をエーテルで洗浄した。濾液と洗液を合わせ、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去後、残渣を中圧シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル=4/1)で精製し、白色結晶性粉末として標題化合物を得た(222mg)。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

34

- 1. 32 (3H, t, J=7Hz)
- 3. 51 (1H, d, J=2Hz)
- 3. 77 (1H, d, J=2Hz)
- 4. 2~4. 3 (2H, m)
- 6. 22 (1H, d, J=8Hz)
- 6. 67 (1H, d, J=8Hz)
- 7. 1~7. 4 (10H, m)

【0105】(1-5) (2S, 3S)-3-ジフェニルメチルカルバモイルオキシラン-2-カルボン酸の合成

上記(1-4)で得た(2S, 3S)-3-ジフェニルメチルカルバモイルオキシラン-2-カルボン酸エチル(5.50g, 16.9ミリモル)をエタノール(300mL)に溶解させ、氷冷下0.5N水酸化カリウム/エタノール溶液(40.4mL, 20.2ミリモル)を加え、室温で3時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、水(300mL)を加えたのち、エーテル(100mL×2)で洗浄した。水層に2N塩酸を加えてpH1~2とし、酢酸エチル(100mL×3)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、白色結晶性粉末として標題化合物を得た(4.76g)。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ

- 3. 57 (1H, d, J=2Hz)
- 3. 71 (1H, d, J=2Hz)
- 6. 23 (1H, s)
- 7. 2~7. 4 (10H, m)

【0106】(1-6) [4-[(2S, 3S)-3-ジフェニルメチルカルバモイルオキシラン-2-カルボニル]-1-ピペラジニル]メチレンビスホスホン酸テトラベンジルの合成

上記(1-5)で得た(2S, 3S)-3-ジフェニルメチルカルバモイルオキシラン-2-カルボン酸(298mg, 1.00ミリモル)とN-ヒドロキシコハク酸イミド(116mg, 1.01ミリモル)の塩化メチレン(8mL)懸濁液に、氷冷下にN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(212mg, 1.03ミリモル)を加え、5℃で攪拌した。1時間後、上記(1-3)で得た(1-ピペラジニル)メチレンビスホスホン酸テトラベンジル p-トルエンスルホン酸塩と(1-ピペラジニル)メチレンビスホスホン酸トリベンジル p-トルエンスルホン酸塩の混合物(762mg, 前者の化合物含量:523mg, 0.66ミリモル、後者の化合物含量:239mg, 0.34ミリモル)及びN-メチルモルホリン(113mg, 1.11ミリモル)を加え、同温度で1.5時間、さらに室温で4時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、残留物に酢酸エチル及び水を加え、不溶物(DC-Urea)を濾別した。濾液から有機層を分取し、10%クエン酸水溶液、飽和重曹水及び飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し

50

た。減圧下溶媒留去後、残留物を中間シリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム／メタノール＝25／1）で精製し、白色粉末として標題化合物を得た（398mg）。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

2.9~3.0 (4H, m)  
3.2~3.5 (4H, m)  
3.36 (1H, t, J=2.5Hz)  
3.55 (1H, d, J=2Hz)  
3.65 (1H, d, J=2Hz)  
4.9~5.1 (8H, m)  
6.24 (1H, d, J=8Hz)  
6.83 (1H, d, J=8Hz)  
7.2~7.4 (30H, m)

FAB MS (M/z, 相対強度)

900 ([M+H]<sup>+</sup>, 9)

638 ([M-PO<sub>3</sub>Bn]<sup>+</sup>, 29)

#### 【0107】実施例2

[4-[(2S, 3S)-3-ジフェニルメチルカルバモイルオキシラン-2-カルボニル]-1-ピペラジニル]メチレンビスホスホン酸ジナトリウム

化合物例(1)のジナトリウム塩

実施例1の(1-6)で得た化合物(200mg, 0.222ミリモル)の酢酸エチル(4mL)溶液に水(4mL)及び10%パラジウム／炭素(30mg)を加え、室温1気圧で1時間接触水素添加した。さらに炭酸水素ナトリウム(37.3mg, 0.444ミリモル)を加えて2時間接触水素添加後、触媒を濾去した。水層を分取し、水を減圧留去することにより標題化合物を淡褐色粉末として得た(130mg)。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ

3.39 (1H, t, J=1.8Hz)  
3.6~3.8 (4H, m)  
3.82 (1H, d, J=2Hz)  
3.8~4.0 (4H, m)  
4.15 (1H, d, J=2Hz)  
6.19 (1H, s)  
7.3~7.5 (10H, m)

FAB MS (m/z, 相対強度)

606 ([M+Na]<sup>+</sup>, 9)

584 ([M+H]<sup>+</sup>, 7)

IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3408, 3304, 306

2, 3030, 1655, 1543, 1495, 1452, 1246, 1155, 1092, 901, 700, 540, 463

#### 【0108】実施例3

[4-[N-[(2S, 3S)-3-ジフェニルメチルカルバモイルオキシラン-2-カルボニル]グリシル]オキシピペリジノ]メチレンビスホスホン酸テトラベンジル

化合物例(34)

(3-1) 1-ホルミル-4-ピペリドン エチレンケタールの合成

無水酢酸(51.0mL, 0.54ミリモル)に98%ギ酸(21.5mL, 0.57ミリモル)を加え、50~60℃で2時間加熱した。室温まで冷却後、水冷下に4-ピペリドン エチレンケタール(36.0g, 0.25ミリモル)を内温が30℃を越えないように滴下した。室温で1時間攪拌を続け、次に反応混合物に氷水

10 (250mL)を加えてしばらく攪拌し、氷冷下に4N水酸化ナトリウム水溶液を滴下してpH5~6にし、食塩を飽和まで加えた。酢酸エチル(150mL×4)で抽出し、抽出液を合わせて飽和炭酸カリウム水溶液(80mL×2)及び飽和食塩水(80mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒留去後、無色油状物として標題化合物を得た(33.8g)。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

1.6~1.7 (4H, m)  
3.45 (2H, m)  
3.62 (2H, m)  
3.99 (4H, s)  
8.03 (1H, s)

#### 【0109】実施例3

(3-2) (1, 4-ジオキサ-8-アザスピロ[4.5]デカン-8-イル)メチレンビスホスホン酸テトラベンジルの合成

上記(3-1)で得た化合物(2.81g, 16.4ミリモル)の無水THF(16mL)溶液を-5~-10℃に冷却し、オキサリクロリド(1.41mL, 1

30 6.4ミリモル)を滴下し、同温度で1時間、さらに室温で4時間攪拌した。反応混合物を再度-10℃に冷却し、亜リン酸ジベンジルのナトリウム塩のテトラヒドロフラン(25mL)懸濁液[亜リン酸ジベンジル(13.8g, 52.5ミリモル)と60%水素化ナトリウム(1.64g, 41ミリモル)から調製]を内温が5℃を越えないように滴下した。-5~-10℃で0.5時間、次に室温で1時間攪拌後、反応混合物を減圧濃縮し、残留物に酢酸エチル及び水を加えた。有機層を分取し、水層を酢酸エチルで抽出し、有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下で溶媒留去後、残留物を中間シリカゲルカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン／酢酸エチル=1/5)で精製し、白色結晶性粉末として標題化合物を得た(2.48g)。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

1.63 (4H, m)  
3.11 (4H, m)  
3.53 (1H, t, J=2.5Hz)  
3.91 (4H, s)

50 5.0~5.1 (8H, m)

7. 2~7. 4 (20H, m)

【0110】(3-3) (4-オキシペリジノ) メチレンビスホスホン酸テトラベンジルの合成

上記(3-2)で得た化合物(2.04g, 3.01ミリモル)のアセトン(30mL)溶液にピリジントシル酸塩(226mg, 0.90ミリモル)及び水(3mL)を加え48時間加熱還流した。減圧下溶媒留去後、残留物を酢酸エチルに溶解し、飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒留去することにより標題化合物を黄色油状物として得た(2.04g)。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

2. 23 (4H, m)

3. 22 (4H, m)

3. 53 (1H, t, J=25Hz)

5. 0~5. 1 (8H, m)

7. 2~7. 4 (20H, m)

【0111】(3-4) (4-ヒドロキシペリジノ) メチレンビスホスホン酸テトラベンジルの合成

上記(3-3)で得た化合物(2.04g)のメタノール(10mL)溶液に、氷冷下水素化ホウ素ナトリウム(114mg, 3.01ミリモル)を加え、氷冷下で20分間攪拌した。減圧下溶媒留去し、残留物に酢酸エチル及び10%塩化アンモニウム水溶液を加えて有機層を分取し、飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥、減圧下溶媒留去後、得られた白色固体を中圧シリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル)で精製し、白色結晶性粉末として標題化合物を得た(1.41g)。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

1. 4~1. 5 (2H, m)

1. 7~1. 8 (2H, m)

1. 6 (1H, br)

2. 9~3. 0 (2H, m)

3. 1~3. 2 (2H, m)

3. 48 (1H, t, J=25Hz)

3. 59 (1H, m)

5. 0~5. 1 (8H, m)

7. 2~7. 3 (20H, m)

【0112】(3-5) N-[ (2S, 3S) -3-ジフェニルメチルカルバモイルオキシラン-2-カルボニル] グリシンエチルエステルの合成

実施例1の(1-5)で得た(2S, 3S) -3-ジフェニルメチルカルバモイルオキシラン-2-カルボン酸(595mg, 2.00ミリモル)とN-ヒドロキシコハク酸イミド(24gmg, 2.21ミリモル)の塩化メチレン(12mL)懸濁液に、氷冷下にDCC(455mg, 2.21ミリモル)を加え、5℃で攪拌した。30分間後、グリシンエチルエステル塩酸塩(307mg, 2.20ミリモル)及びN-メチルモルホリン(2

24mg, 2.21ミリモル)を加え、同温度で1時間、さらに室温で3時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、残留物に酢酸エチル及び水を加え、不溶物(DC-Urea)を濾別した。濾液から有機層を分取し、10%クエン酸水溶液、飽和重曹水及び飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒留去後、残留物を中間シリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール=30/1)で精製し、白色粉末として標題化合物を得た(658mg)。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

1. 28 (3H, t, J=7Hz)

3. 57 (1H, d, J=2Hz)

3. 63 (1H, d, J=2Hz)

3. 98 (1H, dd, J=18, 5Hz)

4. 04 (1H, dd, J=18, 5Hz)

4. 21 (1H, q, J=7Hz)

6. 22 (1H, d, J=8Hz)

6. 54 (1H, br. t, J=5Hz)

6. 70 (1H, br. d, J=8Hz)

7. 1~7. 4 (10H, m)

【0113】(3-6) N-[ (2S, 3S) -3-ジフェニルメチルカルバモイルオキシラン-2-カルボニル] グリシンの合成

上記(3-5)で得た化合物(648mg, 1.69ミリモル)及び0.5N水酸化カリウム/エタノール溶液(4.1mL, 2.05ミリモル)を用い、実施例1の(1-5)と同様に反応及び処理することにより標題化合物を白色粉末として得た(586mg)。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>, -CD<sub>3</sub>O

D) δ

3. 22 (1H, d, J=2Hz)

3. 66 (1H, d, J=2Hz)

3. 92 (1H, d, J=18Hz)

4. 04 (1H, d, J=18Hz)

6. 23 (1H, s)

7. 2~7. 4 (10H, m)

【0114】(3-7) [4-[N-[ (2S, 3S) -3-ジフェニルメチルカルバモイルオキシラン-2-カルボニル] グリシル] オキシペリジノ] メチレンビスホスホン酸テトラベンジルの合成

上記(3-6)で得た化合物(177mg, 0.50ミリモル)の無水塩化メチレン(10mL)懸濁液に、(3-4)で得た(4-ヒドロキシペリジノ) メチレンビスホスホン酸テトラベンジル(318mg, 0.50ミリモル)、4-ジメチルアミノピリジン(12mg, 0.1ミリモル)及びDCC(144mg, 0.55ミリモル)を加え、室温で一晩攪拌した。不溶物(DC-Urea)を濾別し、濾液を10%クエン酸水溶液、飽和重曹水及び飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒留去後、残留物を中間シリカゲル

カラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン/酢酸エチル = 1/10) で精製し、淡褐色粘稠油状物として標題化合物を得た (267mg)。

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$

- 1. 5~1. 8 (4H, m)
- 2. 8~3. 0 (2H, m)
- 3. 0~3. 2 (2H, m)
- 3. 40 (1H, t,  $J=25\text{Hz}$ )
- 3. 63 (1H, d,  $J=2\text{Hz}$ )
- 3. 70 (1H, d,  $J=2\text{Hz}$ )
- 3. 88 (1H, dd,  $J=18, 5\text{Hz}$ )
- 4. 04 (1H, dd,  $J=18, 5\text{Hz}$ )
- 4. 79 (1H, m)
- 4. 9~5. 1 (8H, m)
- 6. 25 (1H, d,  $J=8\text{Hz}$ )
- 6. 53 (1H, br. t,  $J=5\text{Hz}$ )
- 7. 00 (1H, d,  $J=8\text{Hz}$ )
- 7. 1~7. 4 (30H, m)

FAB MS ( $m/z$ , 相対強度)

972 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 5)

638 ( $[\text{M}-\text{PO}_3\text{Bn}_2]^+$ , 35)

#### 【0115】実施例4

[4- [N- [(2S, 3S) -3-ジフェニルメチルカルバモイルオキシラン-2-カルボニル] グリシル] オキシペリジノ] メチレンビスホスホン酸ジナトリウム

化合物例 (2) のジナトリウム塩

実施例3の (3-7) で得た化合物 (152mg, 0. 156ミリモル) を実施例2と同様に接触水素添加及びナトリウム塩化することにより標題化合物を淡褐色粉末として得た (101mg)。

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$

- 2. 0~2. 3 (4H, m)
- 3. 36 (1H, t,  $J=17\text{z}$ )
- 3. 6~3. 8 (2H, m)
- 3. 80 (1H, d,  $J=2\text{Hz}$ )
- 3. 85 (1H, d,  $J=2\text{Hz}$ )
- 3. 8~4. 0 (2H, m)
- 4. 15 (2H, s)
- 5. 13 (1H, m)
- 6. 17 (1H, s)
- 7. 3~7. 5 (10H, m)

FAB MS ( $m/z$ , 相対強度)

606 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 5)

584 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 6)

IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3408, 3032, 174

5, 1670, 1541, 1535, 1203, 111

5, 1036, 895, 700, 544

#### 【0116】実施例5

[4- [(2S, 3S) -3-ジフェニルメチルカルバ

モイルオキシラン-2-カルボニル] オキシペリジノ] メチレンビスホスホン酸テトラベンジル

化合物例 (35)

実施例1の (1-5) で得た (2S, 3S) -3-ジフェニルメチルカルバモイルオキシラン-2-カルボン酸 (110mg, 0. 370ミリモル)、(4-ヒドロキシペリジノ) メチレンビスホスホン酸テトラベンジル (235mg, 0. 370ミリモル)、4-ジメチルアミノピリジン (9mg, 0. 07ミリモル) 及び DCC (85mg, 0. 41ミリモル) を用い、実施例3の (3-7) と同様に反応及び処理することにより白色アモルファスとして標題化合物を得た (262mg)。

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$

- 1. 5~1. 8 (4H, m)
- 2. 8~3. 0 (2H, m)
- 3. 1~3. 2 (2H, m)
- 3. 38 (1H, t,  $J=25\text{Hz}$ )
- 3. 50 (1H, d,  $J=2\text{Hz}$ )
- 3. 86 (1H, d,  $J=2\text{Hz}$ )
- 4. 78 (1H, m)
- 4. 9~5. 1 (8H, m)
- 6. 25 (1H, d,  $J=8\text{Hz}$ )
- 7. 00 (1H, d,  $J=8\text{Hz}$ )
- 7. 1~7. 4 (30H, m)

FAB MS ( $m/z$ , 相対強度)

915 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 6)

653 ( $[\text{M}-\text{PO}_3\text{Bn}_2]^+$ , 30)

#### 【0117】実施例6

[4- [(2S, 3S) -3-ジフェニルメチルカルバモイルオキシラン-2-カルボニル] オキシペリジノ] メチレンビスホスホン酸ジナトリウム

化合物例 (3) のジナトリウム塩

実施例5で得た化合物 (252mg, 0. 275ミリモル) の酢酸エチル (4mL) 溶液に水 (4mL) 及び10%パラジウム/炭素 (40mg) を加え、室温1気圧で接触水素添加した。4時間後、反応混合物に炭酸水素ナトリウム (46. 2mg, 0. 550ミリモル) 及び水 (2mL) を加えて15分間攪拌し、触媒を濾去した。水層を分取し、約3mLまで減圧濃縮し、エタノール (約10mL) を加えた。析出物を濾取し、エタノールで洗浄、50℃で減圧乾燥することにより標題化合物を白色粉末として得た (132mg)。

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$

- 2. 0~2. 3 (4H, m)
- 3. 40 (1H, t,  $J=17\text{Hz}$ )
- 3. 6~3. 8 (2H, m)
- 3. 89 (1H, d,  $J=2\text{Hz}$ )
- 3. 93 (1H, d,  $J=2\text{Hz}$ )
- 3. 8~4. 0 (2H, m)
- 5. 19 (1H, m)

6. 17 (1H, s)

7. 3~7. 5 (10H, m)

FAB MS ( $m/z$ , 相対強度)621 ( $[M+Na]^+$ , 5)599 ( $[M+H]^+$ , 10)

IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 3408, 3032, 1743, 1672, 1533, 1497, 1454, 1284, 1200, 1095, 1030, 985, 897, 700, 540

## 【0118】実施例7

[4-[N-[(2S, 3S)-3-ジフェニルメチルカルバモイルオキシラン-2-カルボニル]グリシル]-1-ピペラジニル]メチレンビスホスホン酸テトラベンジル

## 化合物例(36)

実施例3の(3-6)で得た化合物(177mg, 0.50ミリモル)、N-ヒドロキシコハク酸イミド(63mg, 0.55ミリモル)、DCC(114mg, 0.55ミリモル)、実施例1の(1-3)で得た(1-ピペラジニル)メチレンビスホスホン酸テトラベンジル p-ートルエンスルホン酸塩と(1-ピペラジニル)メチレンビスホスホン酸トリベンジル p-ートルエンスルホン酸塩の混合物(382mg, 前者の化合物; 262mg, 0.33ミリモル, 後者の化合物; 120mg, 0.17ミリモル)及びN-メチルモルホリン(56mg, 0.55ミリモル)を用い、実施例1の(1-6)と同様に反応及び処理することにより、白色アモルファスとして標題化合物を得た(239mg)。

 $^1H$  NMR (400MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ 

2.92 (4H, m)

3.12 (2H, m)

3.34 (1H, t,  $J=2.5$ Hz)

3.40 (2H, m)

3.55 (1H, d,  $J=2$ Hz)3.65 (1H, d,  $J=2$ Hz)3.90 (1H, dd,  $J=1.7, 4$ Hz)3.92 (1H, dd,  $J=1.7, 4$ Hz)

4.9~5.1 (8H, m)

6.23 (1H, d,  $J=8$ Hz)6.71 (1H, d,  $J=8$ Hz)7.03 (1H, br. t,  $J=4$ Hz)

7.1~7.4 (30, m)

FAB MS ( $m/z$ , 相対強度)957 ( $[M+H]^+$ , 2)638 ( $[M-PO_3Bn_2]^+$ , 9)

## 【0119】実施例8

[4-[N-[(2S, 3S)-3-ジフェニルメチルカルバモイルオキシラン-2-カルボニル]グリシル]-1-ピペラジニル]メチレンビスホスホン酸ジナトリウム

化合物例(4)のジナトリウム塩

実施例7で得た化合物(229mg, 0.240ミリモル)を実施例6と同様に接触水素添加及びナトリウム塩化することにより標題化合物を白色粉末として得た(130mg)。

 $^1H$  NMR (400MHz,  $D_2O$ )  $\delta$ 3.39 (1H, t,  $J=1.8$ Hz)

3.6~4.0 (8H, m)

3.80 (1H, d,  $J=2$ Hz)10 3.85 (1H, d,  $J=2$ Hz)

4.26 (2H, s)

6.17 (1H, s)

7.3~7.5 (10H, m)

FAB MS ( $m/z$ , 相対強度)663 ( $[M+Na]^+$ , 3)641 ( $[M+H]^+$ , 7)IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 3390, 3062, 166

4, 1535, 1495, 1452, 1240, 117

4, 1093, 1061, 895, 700, 544

## 20 【0120】実施例9

[4-[N-[(2S, 3S)-3-エトキシカルボニルオキシラン-2-カルボニル]-L-ロイシル]-1-ピペラジニル]メチレンビスホスホン酸テトラベンジル

## 化合物例(37)

[N-[(2S, 3S)-3-エトキシカルボニルオキシラン-2-カルボニル]-L-ロイシン(151mg, 0.55ミリモル)、HOSu(63mg, 0.55ミリモル)、DCC(114mg, 0.55ミリモル)、実施例1の(1-3)で得た(1-ピペラジニル)メチレンビスホスホン酸テトラベンジル p-ートルエンスルホン酸塩と(1-ピペラジニル)メチレンビスホスホン酸トリベンジル p-ートルエンスルホン酸塩の混合物(382mg, 前者の化合物含量; 262mg, 0.33ミリモル, 後者の化合物含量; 120mg, 0.17ミリモル)及びN-メチルモルホリン(56mg, 0.55ミリモル)を用い、実施例1の(1-6)と同様に反応及び処理することにより、無色粘稠油状物として標題化合物を得た(152mg)。

40  $^1H$  NMR (400MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ 0.88 (3H, d,  $J=6$ Hz)0.95 (3H, d,  $J=7$ Hz)

1.2~1.6 (3H, m)

1.31 (3H, t,  $J=7$ Hz)

2.8~3.0 (4H, m)

3.2~3.3 (2H, m)

3.3~3.5 (2H, m)

3.38 (1H, t,  $J=2.5$ Hz)3.46 (1H, d,  $J=2$ Hz)50 3.64 (1H, d,  $J=2$ Hz)

4. 2~4. 3 (2H, m)  
 4. 86 (1H, m)  
 5. 0~5. 1 (8H, m)  
 7. 2~7. 4 (20H, m)

## 【0121】実施例10

[4-[N-[ (2S, 3S) -3-エトキシカルボニルオキシラン-2-カルボニル]-L-ロイシル]-1-ピペラジニル] メチレンビスホスホン酸ジナトリウム化合物例(12)のジナトリウム塩

実施例9で得た化合物(142mg, 0.162ミリモル)を実施例6と同様に接触水素添加及びナトリウム塩化して標題化合物を白色粉末として得た(75mg)。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ

- 0.94 (3H, d, J=6Hz)  
 0.95 (3H, d, J=6Hz)  
 1.53 (1H, m)  
 1.67 (2H, m)  
 3.41 (1H, t, J=18Hz)  
 3.6~4.0 (8H, m)  
 3.76 (1H, d, J=2Hz)  
 3.82 (1H, d, J=2Hz)  
 4.31 (2H, q, J=7Hz)  
 4.91 (1H, dd, J=10, 4Hz)

FAB MS (m/z, 相対強度)

582 ([M+Na]<sup>+</sup>, 12)

560 ([M+H]<sup>+</sup>, 18)

IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3398, 3390, 296

0, 2872, 1745, 1645, 1541, 1535, 1471, 1448, 1371, 1308, 1277, 1205, 1095, 1020, 958, 899, 542

## 【0122】実施例11

[4-[N-[ (2S, 3S) -3-カルボキシオキシラン-2-カルボニル]-L-ロイシル]-1-ピペラジニル] メチレンビスホスホン酸テトラベンジル化合物例(31)

実施例9で得た化合物(187mg, 0.213ミリモル)と0.5N水酸化カリウム/エタノール溶液(0.47mL, 0.235ミリモル)を用い、実施例1の(1-5)と同様に反応及び処理して、標題化合物を無色飴状物として得た(117mg)。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

- 0.91 (3H, d, J=6Hz)  
 0.93 (3H, d, J=6Hz)  
 1.37 (1H, m)  
 1.5~1.7 (2H, m)  
 2.8~3.1 (4H, m)  
 3.2~3.3 (2H, m)  
 3.34 (1H, t, J=25Hz)  
 3.5~3.6 (2H, m)

- 3.56 (1H, d, J=2Hz)

- 3.65 (1H, d, J=2Hz)

- 4.9~5.1 (9H, m)

- 7.2~7.4 (20H)

- 8.13 (1H, d, J=9Hz)

## 【0123】実施例12

[4-[N-[ (2S, 3S) -3-カルボキシオキシラン-2-カルボニル]-L-ロイシル]-1-ピペラジニル] メチレンビスホスホン酸トリナトリウム

10 化合物例(15)のトリナトリウム塩

実施例11で得た化合物(172mg, 0.203ミリモル)を実施例6と同様に接触水素添加及びナトリウム塩化して標題化合物を白色粉末として得た(108mg)。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ

- 0.94 (3H, d, J=6Hz)

- 0.95 (3H, d, J=6Hz)

- 1.52 (1H, m)

- 1.6~1.8 (2H, m)

20 3.41 (1H, t, J=18Hz)

- 3.45 (1H, d, J=2Hz)

- 3.59 (1H, d, J=2Hz)

- 3.6~6.0 (8H, m)

- 4.90 (1H, dd, J=10, 4Hz).

FAB MS (m/z, 相対強度)

576 ([M+Na]<sup>+</sup>, 6)

554 ([M+H]<sup>+</sup>, 6)

IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3421, 2960, 287

1, 1632, 1554, 1444, 1387, 1242, 1155, 1095, 958, 899, 544, 463

## 【0124】実施例13

[4-[N-[ (2S, 3S) -3-エトキシカルボニルオキシラン-2-カルボニル]-L-ロイシル-L-ロイシル]-1-ピペラジニル] メチレンビスホスホン酸テトラベンジル

化合物例(38)

N-[ (2S, 3S) -3-エトキシカルボニルオキシラン-2-カルボニル]-L-ロイシル-L-ロイシル(387mg, 1.00ミリモル)、HOSu(116mg, 1.0ミリモル)、DCC(207mg, 1.0ミリモル)、実施例1の(1-3)で得た(1-ピペラジニル)メチレンビスホスホン酸テトラベンジル p-トルエンスルホン酸塩と(1-ピペラジニル)メチレンビスホスホン酸トリベンジル p-トルエンスルホン酸塩の混合物(767mg、前者の化合物含量; 547mg, 0.69ミリモル、後者の化合物含量; 220mg, 0.31ミリモル)及びN-メチルモルホリン(113mg, 1.11ミリモル)を用い、実施例1の(1-6)と同様に反応及び処理することにより、無色粘稠油

45

状物として標題化合物を得た (556mg)。

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$

0.88 (3H, d,  $J=6\text{Hz}$ )  
 0.92 (6H, d,  $J=6\text{Hz}$ )  
 0.95 (3H, d,  $J=6\text{Hz}$ )  
 1.31 (3H, t,  $J=7\text{Hz}$ )  
 1.3~1.6 (6H, m)  
 2.9~3.1 (4H, m)  
 3.2~3.5 (4H, m)  
 3.38 (1H, t,  $J=25\text{Hz}$ )  
 3.45 (1H, d,  $J=2\text{Hz}$ )  
 3.68 (1H, d,  $J=2\text{Hz}$ )  
 4.2~4.3 (2H, m)  
 4.45 (1H, m)  
 4.83 (1H, m)  
 5.0~5.1 (8H, m)  
 6.54 (1H, d,  $J=8\text{Hz}$ )  
 6.62 (1H, d,  $J=9\text{Hz}$ )  
 7.2~7.4 (20H, m)

FAB MS ( $m/z$ , 相対強度)

989 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 4)

727 ( $[\text{M}-\text{PO}_3\text{Bn}_2]^+$ , 37)

#### 【0125】実施例14

[4-[N-[(2S, 3S)-3-エトキシカルボニルオキシラン-2-カルボニル]-L-ロイシル-L-ロイシル]-1-ピペラジニル]メチレンビスホスホン酸ジナトリウム

化合物例(16)のジナトリウム塩

実施例13で得た化合物(289mg, 0.292ミリモル)を実施例2と同様に接触水素添加及びナトリウム塩化して標題化合物を白色粉末として得た(196mg)。

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$

0.8~1.0 (12H, m)  
 1.31 (3H, t,  $J=7\text{Hz}$ )  
 1.4~1.7 (6H, m)  
 3.43 (1H, t,  $J=18\text{Hz}$ )  
 3.74 (1H, s)  
 3.80 (1H, s)  
 3.6~4.0 (8H, m)  
 4.31 (1H, q,  $J=7\text{Hz}$ )  
 4.44 (1H, m)  
 4.87 (1H, dd,  $J=10, 4\text{Hz}$ )

FAB MS ( $m/z$ , 相対強度)

695 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 15)

673 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 19)

IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3398, 2958, 287

2, 1743, 1655, 1647, 1541, 153

5, 1470, 1448, 1369, 1277, 120

5, 1163, 1095, 1030, 899, 544

46

#### 【0126】実施例15

[4-[N-[(2S, 3S)-3-カルボキシオキシラン-2-カルボニル]-L-ロイシル-L-ロイシル]-1-ピペラジニル]メチレンビスホスホン酸テトラベンジル

化合物例(39)

実施例13で得た化合物(214mg, 0.216ミリモル)と0.5N水酸化カリウム/エタノール溶液

(0.48mL, 0.24ミリモル)を用い、実施例10の(1-5)と同様に反応及び処理して、標題化合物を白色アモルファスとして得た(202mg)。

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$

0.8~1.0 (12H, m)  
 1.3~1.7 (6H, m)  
 2.8~3.1 (4H, m)  
 3.2~3.5 (4H, m)  
 3.37 (1H, t,  $J=25\text{Hz}$ )  
 3.56 (1H, d,  $J=1\text{Hz}$ )  
 3.62 (1H, d,  $J=1\text{Hz}$ )  
 4.54 (1H, m)  
 4.89 (1H, m)  
 5.0~5.12 (8H, m)  
 7.05 (1H, br)  
 7.2~7.4 (21H, m)

#### 【0127】実施例16

[4-[N-[(2S, 3S)-3-カルボキシオキシラン-2-カルボニル]-L-ロイシル-L-ロイシル]-1-ピペラジニル]メチレンビスホスホン酸トリナトリウム

化合物例(17)のトリナトリウム塩

実施例15で得た化合物(195mg, 0.203ミリモル)を実施例6と同様に接触水素添加及びナトリウム塩化して標題化合物を白色粉末として得た(108mg)。

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$

0.8~1.0 (12H, m)  
 1.4~1.8 (6H, m)  
 3.41 (1H, t,  $J=18\text{Hz}$ )  
 3.44 (1H, d,  $J=2\text{Hz}$ )  
 3.57 (1H, d,  $J=2\text{Hz}$ )  
 3.6~4.0 (8H, m)  
 4.42 (1H, m)  
 4.88 (1H, dd,  $J=10, 4\text{Hz}$ )

FAB MS ( $m/z$ , 相対強度)

689 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 4)

667 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 5)

IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3427, 2958, 287

1, 1631, 1541, 1535, 1468, 144

8, 1387, 1246, 1155, 1115, 109

7, 899, 544, 463



## 【0128】実施例17

[3-[4-[N-[(2S, 3S)-3-エトキシカルボニルオキシラン-2-カルボニル]-L-ロイシル]-1-ピペラジニル]-3-オキソ]プロパン-1, 1-ビスホスホン酸テトラベンジル

## 化合物例(40)

(17-1) 2-(tert-ブトキシカルボニル)エチル-1, 1-ビスホスホン酸テトラベンジルの合成

窒素雰囲気下、メチレンビスホスホン酸テトラベンジル

(3.45g, 6.43ミリモル)を乾燥テトラヒドロフラン(17mL)に溶解させ、氷冷下60%水素化ナトリウム(514mg, 12.9ミリモル)を加え、そのままの温度で20分間攪拌した。これに、氷冷下ブromo酢酸tert-ブチル(0.95mL, 6.43モル)を加え、室温で1時間40分攪拌した。反応溶液を飽和塩化アンモニウム水溶液(50mL)に注ぎクロロホルム

(50mL×3)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去後、残渣を中圧シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル=1/1~1/2)で精製して、無色油状物として標題化合物を得た(2.80g)。

<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

1.34(9H, s)  
2.83(2H, dt, J=6.16Hz)  
3.31(2H, tt, J=6.24Hz)  
5.0~5.1(8H, m)  
7.2~7.4(20H, m)

【0129】(17-2) 2-カルボキシエチル-1, 1-ビスホスホン酸テトラベンジルの合成

上記(17-1)で得た化合物(2.80g, 4.30ミリモル)を98%ギ酸(10mL)に溶解させ、室温で3時間攪拌した。ギ酸を減圧留去後、冷却した10%飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(50mL)を加え、酢酸エチル(50mL×2)で抽出した。酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、無色油状物として標題化合物を得た(2.12g)。

<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

2.91(2H, dt, J=6.16Hz)  
3.29(1H, tt, J=6.24Hz)  
4.9~5.0(8H, m)  
7.2~7.3(20H, m)

【0130】(17-3) (2S, 3S)-3-

[[[(S)-3-メチル-1-[4-(tert-ブトキシカルボニル)-1-ピペラジニル]カルボニル]ブチル]カルバモイル]オキシラン-2-カルボン酸エチルの合成

N-[(2S, 3S)-エトキシカルボニルオキシラン-2-カルボニル]-L-ロイシン(2.23g, 7.32ミリモル)、1-ピペラジニルカルボン酸tert-ブ

チル(1.50g, 8.05ミリモル)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(1.09g, 8.05ミリモル)、N-メチルモルホリン(0.88mL, 8.00ミリモル)を乾燥テトラヒドロフラン(50mL)に溶解させ、氷冷下に塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(1.54g, 8.05ミリモル)を徐々に添加した。そのままの温度で2時間攪拌した後、室温で3時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、水(100mL)と酢酸エチル(100mL)を加え、有機層を分取した。水層を酢酸エチル(50mL×2)で抽出し、先の有機層と合わせ、10%クエン酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄したのち、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣を中圧シリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール=50/1)で精製して、白色アモルファスとして標題化合物を得た(2.02g)。

<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

0.91(3H, d, J=7Hz)  
0.98(3H, d, J=7Hz)  
1.32(3H, t, J=7Hz)  
1.4~1.6(3H, m)  
1.47(9H, s)  
3.4~3.7(8H, m)  
3.47(1H, d, J=2Hz)  
3.66(1H, d, J=2Hz)  
4.2~4.3(2H, m)  
4.95(1H, m)  
6.83(1H, br. d, J=9Hz)

30 【0131】(17-4) (2S, 3S)-3-

[[[(S)-3-メチル-1-(1-ピペラジニル)カルボニル]ブチル]カルバモイル]オキシラン-2-カルボン酸エチルの合成

上記(17-3)で得た(2S, 3S)-3-

[[[(S)-3-メチル-1-[4-(tert-ブトキシカルボニル)-1-ピペラジニル]カルボニル]ブチル]カルバモイル]オキシラン-2-カルボン酸エチル(2.02g, 4.58ミリモル)をトリフルオロ酢酸(4mL)に溶解させ、0℃で1時間30分攪拌した。溶媒を減圧留去後、残渣をクロロホルム(60mL)に溶解させ、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(50mL)と飽和食塩水で順次洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去して、白色アモルファスとして標題化合物を得た(1.51g)。

40 <sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ  
0.91(3H, d, J=7Hz)  
0.98(3H, d, J=7Hz)  
1.31(3H, t, J=7Hz)  
1.4~1.7(3H, m)  
2.8~3.0, 3.4~3.6(8H, m)

<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

0.91(3H, d, J=7Hz)  
0.98(3H, d, J=7Hz)  
1.31(3H, t, J=7Hz)  
1.4~1.7(3H, m)  
2.8~3.0, 3.4~3.6(8H, m)

49

3. 47 (1H, d, J=2Hz)

3. 66 (1H, d, J=2Hz)

4. 2~4. 4 (2H, m)

4. 97 (1H, m)

6. 93 (1H, br. d, J=9Hz)

【0132】(17-5) [3-[4-[N-[(2S, 3S)-3-エトキシカルボニルオキシラン-2-カルボニル]-L-ロイシル]-1-ピペラジニル]-3-オキソ] プロパン-1, 1-ビスホスホン酸テトラベンジルの合成

(17-2) で得た2-カルボキシエチル-1, 1-ビスホスホン酸テトラベンジル (595mg, 1.00ミリモル) とHOSu (115mg, 1.00ミリモル) を酢酸エチル (2mL) に溶解させ、氷冷下DCC (206mg, 1.00ミリモル) の酢酸エチル (1mL) 溶液を添加し、室温で30分間攪拌した。これに、上記の(2S, 3S)-3-[[[(S)-3-メチル-1-(1-ピペラジニル)カルボニル]ブチル]カルバモイル]オキシラン-2-カルボン酸エチル (431mg, 1.00ミリモル) の酢酸エチル (1mL) 溶液を氷冷下に加え、5℃で1時間攪拌した後、室温で一晩攪拌した。析出した不溶物(DC-Urea、N, N'-ジシクロヘキシルウレア)を濾別し、酢酸エチルで洗浄した。濾液と洗液を合わせ、10%クエン酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣を中圧シリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/メタノール=50/1)で精製して、白色アモルファスとして標題化合物を得た(164mg)。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

0. 91 (3H, d, J=7Hz)

0. 97 (3H, d, J=7Hz)

1. 32 (3H, t, J=7Hz)

1. 4~1. 7 (3H, m)

2. 7~2. 9 (2H, m)

3. 1~3. 6 (8H, m)

3. 46 (1H, d, J=2Hz)

3. 66 (1H, d, J=2Hz)

3. 69 (1H, tt, J=6, 24Hz)

4. 2~4. 3 (2H, m)

4. 87 (1H, m)

4. 9~5. 1 (8H, m)

6. 79 (1H, br. d, J=9Hz)

7. 2~7. 4 (20H, m)

【0133】実施例18

[3-[4-[N-[(2S, 3S)-3-カルボキシオキシラン-2-カルボニル]-L-ロイシル]-1-ピペラジニル]-3-オキソ] プロパン-1, 1-ビスホスホン酸テトラベンジル

化合物例(41)

50

実施例17の(17-5)で得た化合物(164mg, 0.178ミリモル)と0.5N水酸化カリウム/エタノール溶液(0.39mL, 0.195ミリモル)を用い、実施例1の(1-5)と同様に反応及び処理して、白色アモルファスとして標題化合物を得た(150mg)。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

0. 93 (3H, d, J=7Hz)

0. 96 (3H, d, J=7Hz)

10 1. 5~1. 8 (3H, m)

2. 80 (2H, dt, J=6, 16Hz)

3. 2~3. 5 (6H, m)

3. 5~3. 6 (4H, m)

3. 67 (1H, tt, J=6, 24Hz)

4. 9~5. 1 (9H, m)

7. 2~7. 4 (20, m)

7. 69 (1H, br)

【0134】実施例19

[3-[4-[N-[(2S, 3S)-3-カルボキシオキシラン-2-カルボニル]-L-ロイシル]-1-ピペラジニル]-3-オキソ] プロパン-1, 1-ビスホスホン酸トリナトリウム

化合物例(18)のトリナトリウム塩

実施例18で得た化合物(150mg, 0.169ミリモル)を実施例6と同様に接触水素添加及びナトリウム塩化して、標題化合物を白色粉末として得た(97.0mg)。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ

0. 94 (6H, d, J=6Hz)

30 1. 5~1. 8 (3H, m)

2. 68 (1H, tt, J=6, 24Hz)

2. 8~3. 0 (2H, m)

3. 45 (1H, d, J=2Hz)

3. 59 (1H, d, J=2Hz)

3. 5~3. 9 (8H, m)

4. 89 (1H, m)

IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3415, 3275, 295

8, 2872, 1628, 1470, 1443, 128

7, 1282, 1246, 1169, 1086, 101

40 6, 897, 766, 530, 467

【0135】実施例20

[4-[[(2S, 3S)-3-[(S)-3-メチル-1-(3-メチルブチルカルバモイル)ブチルカルバモイル]オキシラン-2-カルボニル]オキシピペリジノ]メチレンビスホスホン酸テトラベンジル

化合物例(42)

(2S, 3S)-3-[(S)-3-メチル-1-(3-メチルブチルカルバモイル)ブチルカルバモイル]-2-オキシランカルボン酸(190mg, 0.605ミリモル)、(4-ヒドロキシピペリジノ)メチレンビス

50

51

ホスホン酸テトラベンジル (350mg, 0.550ミリモル)、4-ジメチルアミノピリジン(14.7mg, 0.120ミリモル)及びDC (125mg, 0.605ミリモル)を用い、実施例3の(3-7)と同様に反応及び処理することにより白色アモルファスとして標題化合物を得た(457mg)。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

0.9~1.0 (12H, m)  
1.39 (2H, q, J=7Hz)  
1.5~1.9 (6H, m)  
2.9~3.0 (2H, m)  
3.1~3.3 (4H, m)  
3.40 (1H, t, J=24Hz)  
3.45 (1H, d, J=2Hz)  
3.78 (1H, d, J=2Hz)  
4.38 (1H, m)  
4.78 (1H, m)  
5.0~5.1 (8H, m)  
6.02 (1H, br)  
6.91 (1H, br. d, J=8Hz)  
7.2~7.4 (20H, m)

#### 【0136】実施例21

[4-[(2S, 3S)-3-[(S)-3-メチル-1-(3-メチルブチルカルバモイル)ブチルカルバモイル]オキシラン-2-カルボニル]オキシピペリジノ]メチレンビスホスホン酸ジナトリウム

化合物例(6)のジナトリウム塩

実施例20で得た化合物(457mg, 0.490ミリモル)を実施例6と同様に接触水素添加及びナトリウム塩化することにより、標題化合物を白色粉末として得た(275mg)。

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ

0.8~1.0 (12H, m)

\*

培養液中に遊離されたCa量

$$\text{遊離率 (\%)} = \frac{\text{培養液中に遊離されたCa量}}{\text{培養液中に遊離されたCa量} + \text{骨中のCa量}} \times 100$$

培養液中に遊離されたCa量+骨中のCa量

【0139】次に、被検化合物による骨吸収抑制率

※【0140】

(%)を次式に従って求めた。

※【数2】

PTH、薬物存在下での遊離率-コントロールの遊離率

$$\text{抑制率 (\%)} = (1 - \frac{\text{PTH存在下での遊離率-コントロールの遊離率}}{\text{PTH存在下での遊離率-コントロールの遊離率}}) \times 100$$

PTH存在下での遊離率-コントロールの遊離率

【0141】以上の結果を下記第1表に示す。

★【表1】

【0142】

★

第1表

被検化合物	骨吸収抑制作用 (被検化合物濃度)			
	10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-5</sup> M	10 <sup>-4</sup> M
(1) のジナトリウム塩	28	20	77	120
(2) のジナトリウム塩		26	56	109

52

\* 1. 3~1.7 (6H, m)  
2. 1~2.3 (4H, m)  
3. 1~3.3 (2H, m)  
3.41 (1H, t, J=17Hz)  
3.6~4.0 (4H, m)  
3.82 (1H, br. s)  
3.87 (1H, br. s)  
4.32 (1H, m)  
5.19 (1H, m)

10 IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3398, 3304, 3088, 2958, 2872, 1745, 1653, 1551, 1470, 1387, 1350, 1282, 1198, 1095, 1028, 987, 897, 540

#### 【0137】実施例22

骨吸収抑制作用

生後6~7日齢のICRマウスから頭蓋冠を無菌的に採取し結合組織を取り除いた後、頭蓋冠を正中線に沿って半分に切断した。一対の骨あたり1mLの培養液(modified BGJbメディウム、5%非働化ウシ胎児血清を含有)

20 中で24時間前培養(5%CO<sub>2</sub>、37℃)を行なった。前培養後に、骨一片ずつを種々の濃度の被検化合物を含む上記培養液0.5mLに入れ、副甲状腺ホルモン(PTH)3×10<sup>-7</sup>M存在下72時間培養した。また、被検化合物及びPTH非存在下で培養したものをコントロールとした。培養終了後、72時間の間に培養上清中に遊離されたカルシウム量および骨中(6N塩酸1mLにて溶解)のカルシウム量をオルトクレゾールフタレインコンプレキソン(OCPC)法を用いて測定した。まず、カルシウム遊離率(%)を次式に従って求めた。

【0138】

【数1】

53			54
(3) のジナトリウム塩	30	57	89
(4) のジナトリウム塩	40	60	98
(12) のジナトリウム塩		54	85
(15) のトリナトリウム塩	57	77	91
(16) のジナトリウム塩	42	60	73
(17) のトリナトリウム塩	38	53	79
(18) のトリナトリウム塩	28	51	72

## 【0143】実施例23

## カテプシンL阻害作用

## (23-1) ラット肝臓リソソーム分画の調製

ウイスター系雄性ラットを脱血致死させ、門脈より氷冷した生理食塩水を注入して還流後、肝臓を摘出した。以下の操作は4℃で行なった。はさみで細切後、5gを量りとり、9倍量の0.25Mスクロース液を加えてホモジナイズ（ポッター型テフロンホモジナイザー）した。ホモジネートを800×gで10分間遠心分離して得た上清を、さらに12000×gで20分間遠心分離した。得られた沈澱に0.25Mスクロース液25mLを加えてホモジナイズした後、12000×gで20分間遠心分離した。得られた沈澱に0.25Mスクロース液10mlを加えてホモジナイズしたものをリソソーム分画とした。この分画を0.33%トリトンX-100を含む0.25Mスクロース液で希釈してカテプシンL活性の測定に供した。

## (23-2) カテプシンL活性の測定

340mM酢酸ナトリウム、60mM酢酸、4mMEDTAおよび8mMジチオスレイトールを含む溶液（pH：5. \* 第2表

\* 5) 0.25mLに、リソソーム分画0.1mL、被検

- 10 化合物溶液5μLおよび蒸留水0.545mLを加えて30℃で15分間プレインキュベートした後、基質として50μMカルボベンゾキシ-L-フェニルアラニル-L-アルギニン-4-メチルクマリル-7-アミド(Z-Phe-Arg-MCA) 溶液0.1mLを加えて反応を開始した。30℃で20分間反応させた後、100mMモノクロル酢酸ナトリウム、30mM酢酸ナトリウムおよび70mM酢酸を含む溶液（pH：4.3）1mLを加えて反応を停止した。最終溶液の蛍光強度を励起波長380nm、蛍光波長460nmで測定した。なお、Z-Phe-Arg-MCAは、リソソーム分画に含まれるカテプシンBによっても分解されるため、カテプシンB特異的阻害剤であるCA-074 [村田ほか、FEBS Lett. 280, 307-310(1991)] を反応溶液に10<sup>-7</sup>M添加してカテプシンBを完全に阻害した条件下で測定を行なった。

【0144】結果を下記第2表に示す。

## 【0145】

## 【表2】

被検化合物	カテプシンL阻害 IC <sub>50</sub> (M)
(12) のジナトリウム塩	2.4×10 <sup>-6</sup>
(15) のトリナトリウム塩	1.5×10 <sup>-7</sup>
(16) のジナトリウム塩	2.5×10 <sup>-6</sup>
(17) のトリナトリウム塩	5.4×10 <sup>-10</sup>
(18) のトリナトリウム塩	1.9×10 <sup>-6</sup>

## 【0146】実施例24

## 毒性試験

150～200mgのウイスター系ラットに本発明化合 ※

※物（前記の実施例6記載の化合物）を2週間にわたり連

- 40 日経口投与（100mg/kg）したが重篤な副作用は、観察されなかった。



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08325282 A**(43) Date of publication of application: **10.12.96**

(51) Int. Cl.

**C07F 9/655**  
**A61K 31/665**  
**A61K 31/675**  
**C07F 9/6558**

(21) Application number: **08104498**(22) Date of filing: **01.04.96**(30) Priority: **31.03.95 JP 07100503**(71) Applicant: **NIPPON CHEMIPHAR CO LTD**

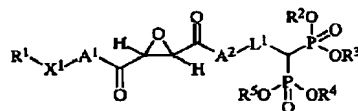
(72) Inventor: **NOMURA YUTAKA**  
**TAKAHASHI TOSHIHIRO**  
**HARA KAORU**  
**YOSHINO YASUSHI**  
**MAZAKI MITSUO**

(54) **BISPHOSPHONIC ACID DERIVATIVE**

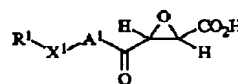
## (57) Abstract:

**PURPOSE:** To obtain a bisphosphonic acid derivative, having a partial structure of epoxysuccinic acid and capable of manifesting inhibiting activities against cysteine proteases and providing a therapeutic agent for osteopathy and a medicine for treatment, prevention, etc., of diseases in which abnormal sthenia of cathepsins L and B participate.

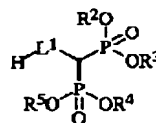
**CONSTITUTION:** The new bisphosphonic acid derivative of formula I {R<sup>1</sup> is H, an alkyl or an aralkyl; X<sup>1</sup> is O or NR<sup>6</sup> (R<sup>6</sup> is the same species as that of R<sup>1</sup>) or a bivalent heterocyclic ring residue; A<sup>1</sup> is a single bond, an amino acid residue or a dipeptide residue having the right side as the N-terminal; A<sup>2</sup> is a single bond, an amino acid residue or a dipeptide residue having the left side as the N-terminal; L is a bivalent connecting group; R<sup>2</sup> to R<sup>5</sup> are each is the same species as that of R<sup>1</sup>}, etc., having a partial structure of epoxysuccinic acid and capable of manifesting inhibiting activities against cysteine proteases and useful as a therapeutic agent for osteopathy and a therapeutic, a preventing agents, etc., for diseases in which abnormal sthenia of cathepsins L and B participate. The compound is obtained by reacting an epoxysuccinic acid derivative of formula II with a biphosphonic acid derivative of formula III in the presence of a condensing agent.



I



II



III